شناسایی عفونت مایکوپلاسمایی در رده های سلولی با روش PCR-ELISA

محمد رضا عربستانی [۱*]، فاتح رحیمی [۲]

۱. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان
۲. دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

* **نشانی برای مکاتبه:** خیابان شهید فهمیده، روبروی پارک مردم، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی.
mohammad.arabestani@gmail.com
دریافت مقاله: مرداد نود و دو پذیرش برای چاپ: مهر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *مایکوپلاسماها به ویژه گونه هایی از جنس مایکوپلاسما و آکولوپلاسما بعنوان آلوده کنندگان میکروبی، رده های سلولی که فرآورده بیولوژیکی تولید می کنند، در نظر گرفته می شوند. هدف از این مطالعه تشخیص سریع و دقیق آلودگی رده های سلولی به انواع مختلف ما یکو پلاسما توسط روشهای مولکولی از قبیل PCR-ELISA می باشد.*

روش کار: *مطالعه حاضر به شیوه ارزیابی یک تست تشخیصی صورت پذیرفت. این روش بر اساس واکنش PCR- ELISA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما، پرایمر های اختصاصی گونه های مختلف مایکوپلاسما که همگی با Digoxigenine نشان دار شده و هم چنین پروب اختصاصی جنس مایکوپلاسما که با بیوتین نشان دار شده بود، انجام گرفت.*

یافته ها: *جهت ارزیابی آلودگی رده های سلولی به مایکوپلاسما تعداد 183 رده سلولی مختلف موجود دربانک سلولی انستیتو پاستور ایران بررسی شد. با روش PCR ۴۸/۶ در صد رده های سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند. با روش PCR-ELISA نیز نتایج به دست آمده با PCR تایید گردید و هیچ گونه اختلافی بین نتایج به دست آمده توسط روش PCR و PCR-ELISA مشاهده نشد. در حالی که با روش کشت میکروبی ۲۷/۳ در صد از رده های سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند .نتایج بدست آمده توسط روش PCR-ELISA در مقایسه با روش کشت میکروبی حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۷۰/۷ درصد را نشان داد.*

نتیجه گیری: *از آن جائی که روش معمول برای تشخیص آلودگی رده های سلولی به مایکو پلاسما روش کشت میکروبی و رنگ آمیزی است واین روش ها زمان بر بوده و از حساسیت پائینی نیز برخوردار هستند و سرعت عمل درتشخیص آلودگی رده های سلولی به منظور درمان رده سلولی آلوده و جلوگیری از آلوده شدن رده های سلولی سالم حائز اهمیت است لذا توصیه می شوددرمواردورژانسی روش PCR-ELISA را که دارای حساسیت و سرعت عمل بسیار بالاتری است جای گزین روش های فوق گردد.*

واژگان کلیدی: ***مایکوپلاسما، رده های سلولی، کشت میکروبی، PCR-ELISA***

مقدمه

مایکوپلاسماهااز آلوده کنندگان اصلی وعمده رده های سلولی درسرتاسردنیا هستند، بررسی ها نشان داده است که ۵-۸۷ درصدازرده های سلولی به مایکوپلاسما هاآلوده می باشند(۷-۱). این مسئله نتایج بدست آمده ازمطالعات وتحقیقات آزمایشگاهی برروی رده های سلولی راغیرقابل قبول ونامطمئن می سازد. گزارشات مختلفی ازآلودگی رده های سلولی بانکهای سلولی سراسرجهان ارائه گردیده است(۸).

مطالعات نشان می دهدکه مولیکوت ها (Molicutes)رشدوتمایز سلول ها، متابولیسم اسیدهای آمینه واسیدهای نوکلئیک، تولیدفرآورده های بیولوژیکی ازقبیل سیتوکین ها، منوکین ها وآنتی بادی های مونوکلونال راتحت تاثیر قرارمی دهند. برخلاف آلودگی باکتریایی وقارچی آلودگی مولیکوت ها معمولادرمحیط تولید هیچ گونه کدورت واضحی نمی کنند. هم چنین اکثرمولیکوت ها به آنتی بیوتیک های معمول مورداستفاده درکشت های سلولی مقاوم هستند. به منظورپیش گیری ازاین عمل نیازبه تشخیص آلودگی سریع ودقیق رده های سلولی به انواع مختلف مایکوپلاسما ضروری می باشد. منشاء آلودگی کشت های سلولی به مایکوپلاسماممکن است ازطریق پرسنل آزمایشگاهی , سرم های تجارتی حیوانات مورداستفاده درکشت های سلولی و رده های سلولی آلوده می تواند صورت بگیرد (۲، ۱۲-۹).

تعدادزیادی روش های تشخیصی برای شناسایی مایکوپلاسماها به کاررفته است که آزمایش مستقیم شامل کشت میکروبی می باشدوآزمایشات غیرمستقیم شامل رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم، DNA Probe ، ELISA ، ایمینوفلورسانس وارزیابی های بیوشیمیایی می باشند(۷، ۱۳-۱۶).

ازمهم ترین عیوب روش های معمول تشخیص عفونت رده های سلولی به مایکوپلاسما تجربه ومهارت شخصی ، زمان بربودن وسختی روش می باشند. برای مثال روش ELISA دارای واکنش متقاطع وحساسیت پایین است و نیازبه تعدادزیادی سلول مایکوپلاسما جهت تشخیص داردونتایج مثبت کاذب نیز در این روش مشاهده می شود. درروش رنگ آمیزی با رنگ های فلوروکروم،روش پیچیده است و باترکیبات محیط کشت،پوسته های باقی مانده سلولی ،با DNA میتوکندری واکنش نشان مدهد وباعث نتایج مثبت کاذب می شود. روش کشت میکروبی نیز خیلی زمان براست وبعضی ازسویه های آلوده کننده اصلی رده های سلولی ازقبیل مایکوپلاسما هیورینیس (M.hyorhinis)درمحیط های کشت میکروبی قادربه رشدنمی باشدوبعضی سویه های دیگرازقبیل مایکوپلاسماآرژینینی(M.arginini)کشت آنها مشکل است وبه سختی درمحیط های کشت میکروبی رشدمی کنند. اگرچه کوشش دربهبودی این روش ها انجام گرفته است ولی تشخیص سریع مایکوپلاسما درکشت های سلولی به عنوان یک مشکل جدی باقی مانده است که اخیرا ازتکنیک های PCR، ELISA ،PCR-ELISA، Real Time PCR برای شناسایی مایکوپلاسما استفاده شده است(۱۷،۱۳).

روش کشت میکروبی روش استاندارد تشخیص مایکوپلاسما می باشد(۱۸). ولی درموردکشت میکروبی چون مایکوپلاسما نیازبه زمان طولانی جهت رشددارند(حداقل ده روزوگاهی تا سه هفته) رشدآنها در محیط های کشت اختصاصی مایکوپلاسما طول می کشد واین زمان طولانی باعث ازدست رفتن رده های سلولی و آلودگی رده های سلولی به مایکوپلاسما می شود. لذا استفاده از روش سریع ، حساس واختصاصی که تا حدودی با روش کشت میکروبی هم خوانی داشته باشد بسیارحائزاهمیت می باشد. دراین مقاله ازروش PCR-ELISA به هم راه کشت میکروبی جهت دست رسی به هدف تشخیص سریع ودقیق رده های سلولی آلوده به مایکوپلاسما وتعیین میزان درصد آلودگی رده های سلولی به مایکوپلاسما دربانک سلولی انستیتوپاستورایران استفاده شد.

روش کار

دراین مطالعه که ازنوع ارزیابی یک تست تشخیصی است وتحت عنوان مطالعات ارزیابی فرآیندهاشناخته می شوند تعداد۱۸۳ نمونه از رده های سلولی موجود دربانک سلولی انستیتوپاستورایران به صورت تصادفی بررسی وجهت مشخص نمودن اعتباروروش ها ازآزمون غربال گری استفاده شد(۱۹).رده های سلولی موردآزمایش شامل رده های سلولی انسانی ورده های سلولی غیرانسانی ازقبیل موش، میمون، خوک، گوسفند وگاو بودند. بیشتررده های سلولی موجوددربانک سلولی ازکشورهایی مانند سوئد ، آلمان وآمریکا به بانک سلولی انتقال پیداکرده بودند ودراین با نک تکثیرونگه داری می شدند. از آنجائیکه تست استاندارد برای تشخیص آلودگی رده های سلولی به مایکو پلاسما کشت میکروبی می باشد(۱۸) جهت تائید نتایج PCR-ELISA آزمایش کشت میکروبی مایکو پلاسما بر روی محیط های مخصوص مایکو پلاسما انجام گرفت وسپس روش PCR-ELISA با آن مقایسه گردید.

برای انجام کشت میکروبی ابتدا ۱الی ۲ میلی لیتر نمونه کشت سلولی که آن زردشده بود به محیط کشت PPLO BROTH اضافه شد وبه مدت ۲۴الی ۴۸ ساعت درانکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ رجه سانتی گراد انکوبه گردید. درمرحله بعد۱ میلی لیتر از محیط PPLO BROTH توسط پی پت برداشت شد ودرسانتریفوژبا دور۱۰،۰۰۰ دور بردقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید ، سپس ازرسوب حاصل شده به میزان ۲۰µl به محیط کشت PPLO AGAR اضافه شد ودر انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گرادانکوبه گردید. درنهایت بعد از مدت ۲الی ۳روز محیط کشت درزیرمیکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرارگرفت واین عمل چندین بارجهت تشخیص آلودگی تکرارگردید(۱۸).

جهت انجام PCR-ELISA ابتداDNA مایکوپلاسما به روش پروتئیناز K استخراج گردید. پرایمرها بااستفاده از نرم افزارGene Runner وبراساس توالی ژن 16S rRNA باکتری مایکوپلاسما طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده به شرکت ROCH جهت سنتزسفارش داده شد. جهت انجام PCR دریک لوله اپندورف کلیه موادلازم را مخلوط کرده ، که این مخلوط اصلی (Master Mix) بود که شامل ۲،۵ میکرولیتر بافر10X PCR ، ۱میکرولیتر dNTP10mM ، ۳میکرولیترپرایمرسنس و ۵ میکرومولارآنتی سنس، ۱میکرولیترTag DNA Polymerase ،۱۴،۴ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه، ۱میکرولیتر DNA نمونه ودرنهایت حجم کلی سلول به ۲۵ میکرولیتر رسید. سپس Master Mix در میکروتیوپ هایی که ازقبل مشخصات برروی آنها نوشته شده بود تقسیم می شد. دراین آزمایش نیاز به یک کنترل منفی و یک کنترل مثبت بودکه لازم بود در تهیه Maste Mix مقادیر آنها لحاظ شود. پروفایل دمایی مربوطه شامل سه مرحله ۱- دناتوراسیون دردمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ثانیه ۲- مرحله به هم پیوستن دردمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت۳۰ثانیه ۳- مرحله گسترش در دمای ۷۲درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ثانیه تکثیرشد.سپس درپایان سیکل ۳۲ مرحله گسترش به مدت ۵دقیقه دردمای ۷۲درجه سانتی گراد گسترش یافت تا سنتز زنجیره های نیمه تمام کامل شوند.پس از اتمام مراحل PCR نمونه ها تا زمان آنالیز برروی ژل آگارز، درداخل یخچال نگه داری شدند. جهت مشاهده محصولات PCR ازژل آگارز۲درصد استفاده شد. نمونه های مورد نظربه همراه Loading buffer به چاهک ها اضافه والکتروفورز با ولتاژ ۶۰ولت برای یک ساعت انجام شد،درمرحله بعد رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت ودرنهایت با دستگاه ترانس ایلومیناتور نتایج مشاهده شدند.

در PCR-ELISA ابتدامحصول PCR خودرابا Digoxigenine نشان دارکرده سپس کف پلیت ۹۶ خانه ای بااسترپت اویدین کوت شد در ادامه پروب طراحی شده که با ماده بیوتین نشان دار شده بود اضافه گردید. (لازم به ذکر است که قبل از اضافه کردن پروب باید ابتداپروب را به مدت ۱الی ۲ دقیقه در آب جوش قرار داد تا از حالت Foldingخارج شود). درادامه محصولات PCR نشان دار شده با Digoxigenine را به مدت ۱الی ۲ دقیقه در آب جوش قرار داده تا دو رشته DNA از هم جدا شوند و بافر هیبریداسیون را به هر خانه پلیت اضافه نموده سپس محصولات PCR اضافه شد درمرحله بعد ماده کونژوگه که آنتی بادی ضد Digoxigenine بود اضافه شدو در نهایت سوبسترای واکنش مانند TMB (تترامتیل بنزیدین)اضافه شد و تغییر رنگ را مشاهده کرده OD آن با دستگاه ELISA READER قرائت شد.

یافته ها

پس از اثبات کارآئی ویژگی پرایمرها جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما تعداد ۱۸۳ رده سلولی ذخیره شده در بانک سلولی به صورت تصادفی انتخاب شدند و آزمون PCR اختصاصی جنس و گونه مایکوپلاسما بر روی تمامی نمونه های DNA انجام شد و تعداد ۸۹ نمونه (۴۰درصد) از نمونه ها مثبت و آلوده به مایکو پلاسما بودند، که بیش ترین سویه های آلوده کننده رده های سلولی بانک سلولی انستیتو پاستور ایران شامل، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما اورال که بیشتر از ۹۰ درصد موارد را تشکیل می دهند و کمتر از ۱۰ درصد موارد مربوط به مایکوپلاسما سالیواریوم، مایکوپلاسما پیروم، آکولوپلاسما لیدلاوی، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم می باشد. نتایج تکنیک PCR-ELISA بر روی این نمونه های مشابه با نتایج PCR بود و نتایج PCR تایید گردید. نکته قابل توجه اینست که OD های حاصل در روش ELISA و قدرت محصولات PCR مشاهده شده روی ژل با یک دیگر کاملا هم خوانی داشتند (جدول ۱). مطابق با کیت تشخیصی مایکوپلاسما بر روی رده های سلولی به روش PCR-ELISA ساخت شرکت ROCH، Cut off point آن ۰/۲۲ تعیین شده است (در روش مذکور نیز Cut off point، ۰/۲۲ در نظر گرفته شده است). بنابراین موارد (۰/۲۲ -۰) = -، (۰/۴-۰/۲۲)= +، (۰/۸-۰/۴)= ++، (۱/۰-۰/۸)= +++ و (۱<)= ++++ محاسبه گردید. تعداد ۵۰ مورد از نمونه ها توسط روش کشت میکروبی و روش PCR-ELISA مثبت شدند (True Positive)تعداد ۳۹ مورد توسط روش PCR-ELISA مثبت و توسط روش کشت منفی شدند(False Positive) تعداد ۹۴ مورد توسط روش کشت و روش PCR-ELISA منفی شدند (True Negative) و موردی پیدا نشد که توسط کشت مثبت باشد و توسط PCR-ELISA منفی باشد(False Negative) (جدول ۲) . حساسیت آزمایش PCR-ELISA در مقایسه با کشت میکروبی ۱۰۰ درصد می باشد بدین مفهوم که تمامی موارد کشت مثبت با PCR-ELISA نیز قابل تشخیص است. از طرف دیگر ویژگی روش PCR-ELISA در مقایسه با کشت میکروبی ۷۰/۷ درصد می باشد بدین مفهوم که روش PCR-ELISA در مقایسه با کشت ۷۱ مورد منفی آن را می تواند تشخیص بدهد. نتایج تست تعیین حساسیت روش PCR-ELISA بر وی سوش میکروب استاندارد (مایکوپلاسما اورال ATCC 19526) نشان داد تا رقت 10^{-6} (تعداد ۱۰ میکروارگانیسم در هر میلی لیتر) نیز قابلیت تشخیص ارگانیسم را دارد و در رقت بالاتر قادر به تشخیص ارگانیسم نیست.

جدول ۱ . نتایج آزمون ELISA بر روی تعدادی رده های سلولی برای اثبات نتایج PCR

ردیف	کد بانک سلولی ایران	رده های سلولی	OD
۱		M.orale (ATCC 19524)	1.767
۲	NCBI 438	Detroit 532	0.082
۳	NCBI 118	1321 NI	0.182
۴	NCBI C 506	SW 480	1.010
۵	NCBI C 428	DU-145	0.161
۶	NCBI 449	AGO 1529	2.735
۷	NCBI 144	HEP 2	1.019
۸	NCBI C481	SW 1116	1.044
۹	NCBI C456	MEL III	0.154
۱۰		E. coli (ATCC 25922)	0.132
۱۱		D.W	0.075
۱۲		PBS	0.005

جدول ۲. نتایج کشت میکروبی وPCR-ELISA

	PCR-ELISA مثبت	PCR-ELISA منفی
کشت میکروبی مثبت	**۵۰**	**۰**
کشت میکروبی منفی	**۳۹**	**۹۴**
جمع	**۸۹**	**۹۴**

بحث

مایکوپلاسماهاازآلوده کنندگان اصلی رده های سلولی درآزمایشگاه می باشندوتوسط میکروسکوپ نوری غیرقابل مشاهده هستند.این آلوده کنندگان مزمن رده های سلولی به وسیله چندین روش اختصاصی ازقبیل تغییررنگ با استفاده ازرنگ های اختصاصی درمحیط های کشت ، ELISAبرای تشخیص پروتئین های اختصاصی ،کشت میکروبی وروش های مولکولی قابل شناسایی می باشند.

این مطالعه نشان می دهدکه از ۱۸۳ رده سلولی مورد آزمایش در بانک سلولی انستیتوپاستور ایران نتایج کشت میکروبی آنها برروی محیط مخصوص مایکوپلاسما تعداد ۵۰ رده سلولی(۲۷,۳ درصد)آلودگی به مایکوپلاسمارا نشان دادند.بررسی ها توسط روش حساس و دقیق PCR-ELISA نشان داد که تعداد ۸۹ رده سلولی (۴۸,۶ درصد)آلودگی به مایکوپلاسما دارند .

به عبارتی دیگر می توان استنباط نمود کـه درمـدت زمـان مربوطـه روش کشت در ۲۹ درصد موارد قادربه تشخیص موارد آلودگی نبود درصورتی که با روش PCR-ELISA قابل اندازه گیری می باشد. قابل توجـه اسـت کـه OD خوانده شده در دستگاه ELISA READER با ضخامت باندهای مشاهده شده در روی ژل آگارز ارتباط مستقیمی دارد به این معنی که هـر چه باند مشاهده شده در روی ژل آگارز ضخیم تر باشد OD مربوطه بیشتر می باشد و بالعکس(۲۱،۲۰).

در روش PCR-ELISA در هر آزمایش ۲ تست کنترل منفـی و ۲ تسـت کنترل مثبت استفاده شد. نتایج فوق هم ا هنگ با نتایج بدست آمده توسط سایر محققین تایید می کند که روش PCR-ELISA در مقایسه بـا روش هـای دیگـر از جملـه کشـت میکروبـی ، رنـگ آمیـزی DNA و تکنیـک هیبریداسیون سریع تر وآسان تر می باشد(۱۵-۱۳).

حساسیت آزمایش PCR-ELISA در مقایسـه بـا کشـت میکروبـی ۱۰۰ درصد می باشد. به این مفهوم که تمـامی مـوارد کشـت مثبـت بـا PCR-ELISA نیز قابل تشـخیص اسـت. از طـرف دیگـر ویژگـی روش PCR-ELISA در مقایسه با روش کشت میکروبی ۷۰،۷ درصد می باشـد. یعنـی روش PCR-ELISA در مقایسه بـا کشـت درهمـان مـدت زمـان در۷۱ مورد منفی آن را میتواند تشخیص دهد (منفی کاذب).

از جمله موارد مورد بحث در ایـن مطالعـه ایـن اسـت کـه توسـط آزمـایش PCR-ELISA ۸۹ رده سلولی آلودگی به مایکو پلاسما را نشـان دادنـد .

از موارد دیکر ویژگی پـائین کشـت میکروبـی در مقایسـه بـا روش PCR-ELISA است. این تفاوت می تواند به دلیـل عـدم وجـود شـرایط اپتـیمم کشت برای همه گونه های آلوده کننده باشد. یکی از مهم ترین موارد قابـل بحث در ایـن مطالعـه سـرعت روش PCR-ELISA در مقایسـه بـا روش کشت میکروبی می باشد. در کشت میکروبی بر روی محیط های مخصـوص مایکو پلاسما برای تشخیص آلودگی بـه حـداقل ۱۰ روز زمـان نیـاز اسـت. ولی با روش PCR-ELISA در مدت ۳ تا ۱۰ ساعت جواب آزمـایش داده می شود.

نتیجه گیری

اطمینان ازسالم بودن رده های سلولی ازنظرآلودگی به مایکوپلاسما جهـت تحقیقات مختلف بیولوژیکی وفرآورده هـای تجـارتی بسـیارمهم اسـت. لـذا توصیه می شود روش PCR-ELISA را کـه دارای سـرعت عمـل بسـیار بالاتری است جای گزین روش های کشت درموارد اورژانسی گردد. بـاوجود این پیشنهاد می شوددرموارد عـادی روش PCR-ELISA هـم زمـان بـا کشت میکروبـی باشـد تـا تعیـین هویـت بـاکتری و گونـه آن نیـز تعیـین گردد.مهم ترین یافته این مطالعه قدرت روش PCR-ELISA درتشخیص آلودگی رده های سـلولی بـه مایکوپلاسـما درمقایسـه بـاروش هـای دیگـر تشخیصی می باشد.

REFERENCES

1.Dussrget O& Roulland Dussiox: Rapid, Sensitive PCR-ELISA based detection of mycoplasma in simulated samples of animal sera. Appl Environ microbial. 1994; 60: 953- 959.

2.Somerson NL & Cole BC: The mycoplasma flora of human and nonhuman primates. The mycoplasmas Vol 2. Academic press, New York, 1979. p. 191 -216.

3. Uphoff CC and. Drexler HG: Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2002; 38:79–85.

4.Barile MF & Rottem S: Mycoplasma in cell cultures. In: Rapid diagnosis of mycoplasma Plenum press, New York, 1993. p. 155-193.

5.Mc Garrity GJ , Kotani H& Carson D : Comparative studies to determine the efficiency of 6 methylpnrine to detect cell cuitnre mycplasmas . In Vitro Cell Dev Biol. 1986; 22:301-304

6.Mc Garrity GJ Kotani H& Butler GH: Mycoplasmas and tissue culture cell. In: Mycoplasmas biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washgington DC 1992. p. 445-54.

7.Sambrook J, Fritsch EF & Meniatis T: Molecular cloning. A laboratory manual 2th edition. cold spring harbor lab press , New York 1989. p. 9. 31-9.62.

8.Tang J, Hu M, Lee S & Roblin R: A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contamination in cell culture. J Microbiol Method. 2000; 39: 121-126.

9.Arai S, Harasawaμμ R, Ohno T, Takeuchi M, Lee I, Kato K, Takashi H& Furudera T: Comparative studies to detect mycoplasma Contamination in biondustrial for validating standard method . Int Organ Mycoplasma Lett. 1994; 3: 48-49.

10.Rawadi G, Lecaque D, Pirot D & Roman S: Detection and identification of mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol. 1993; 4: 147-156.

11. Uphoff CC and Drexler HG: Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 2002; 38:86–89.

12. Garner CM, Hubbold LM and Chakraborti PR: Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. Br J Biomed Sci. 2000; 57:295–301.

13.Bolske G: Survey of mycoplasma infection in cell cultures and a comparison of detection methods: Zentrabl Bakteriol Mikrobiol Hy. 1988; 269: 331-340.

14.Hay RJ, Macy ML & Chen TR: Mycoplasma infection of cultred cells. Nature. 1989; 339:487-488.

15.Hyeran S, Seung HK, Yoon JB & Sukgil S: PCR-baced detection of mycoplasma species. J Microbiol. 2006; 44:42-49.

16.Martin L & Jakub N: Rapid test for early detection of mycoplasma contamination of the continuous cell line. Immunol Lett. 2004; 92:215-216

17.Pawar V, Luczak J, Cox MS, Dnbose J & harbell JW: Trends in the incidence and distribution of mycoplasma contamination detected in cell lines and their products. Int Organ Mycoplasma Lett. 1994; 3:77.

18.Blazek R, Schemit U & Hadding U: Fast and simple procedure for the detection of cell culture mycoplasmas using a single monoclonal antibody**.** J Immunol Methods.1990; 131:203-212**.**

19**.** Douglas G,Altman, Practical statistics for medical research, 1th Ed, Champan &hall 1994

20.Chen TR : In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by flurescent Hoechst 3358 stain.EXP cell Res. 1978; 104: 255-262.

21.Wilchek M & Bayer EA: The avidin biotin complex in immunology. Immunol Today. 1984; 5: 39-43.