درمان آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت سلول با سیپرو فلوکساسین و انروفلوکساسین: *گزارش کوتاه*

بیتا سلطانیان[1]
شیوا ایرانی[1]، سروناز هاشمی[2]
سید حمیدرضا مژگانی[2و3]
مهدی آجورلو[2]، یوسف چراغی[4]
علیرضا غلامی[2و5*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران. ۲- آزمایشگاه پژوهش و ساخت واکسن هاری انسانی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ۳- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ٤- گروه تولید واکسن هپاتیت B نوترکیب، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. ۵- گروه تحقیقات و مرکز رفرانس هاری WHO، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری WHO تلفن: ٦٦٤٠٣٤٩٦-٠٢١
E-mail: agholami@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰٦/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

زمینه و هدف: در این مطالعه رده‌های سلولی Vero آلوده به مایکوپلاسما، با رقت‌های مختلف سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین که مانع همانندسازی DNA و سنتز پروتیین می‌شوند، تحت درمان قرار گرفتند.

روش بررسی: در این پژوهش اکتشافی که در آزمایشگاه پژوهش و ساخت واکسن هاری انسانی انستیتو پاستور از آبان ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳انجام گردید، رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت. عملکرد این روش درمانی با PCR ارزیابی شد. با استفاده از روش تاپسیس (Technique for Order of Preference by Similarity to Ideal Solution, TOPSIS) که یک روش تصمیم‌گیری چند جانبه است بهترین اثر غلظت بر زمان به‌دست‌آمده در درمان مایکوپلاسما تعیین شد.

یافته‌ها: بهترین غلظت به‌دست‌آمده جهت درمان مایکوپلاسمایی به‌ترتیب ۲۰ و ۲۰۰ µg/ml از سیپروفلوکساسین و برای درمان سلول‌های آلوده با انروفلوکساسین به‌ترتیب ۳ و ۳۰ و ۳۰۰ µg/ml بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر درمان خط سلولی Vero آلوده به مایکوپلاسما با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین بدون نیاز به تغییر آنتی‌بیوتیک، که در سایر فرایندها معمول است، انجام شد.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما، کشت سلول، سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، Polymerase Chain Reaction (PCR).

مقدمه

کشت سلول به‌عنوان ابزار ضروری برای پژوهش‌های بیولوژیکی، پزشکی و بیوتکنولوژی صنعتی محسوب می‌شود. آلودگی مایکوپلاسمایی حدود ۳۰-۱۰٪ آلودگی‌های کشت سلول را شامل می‌شود که یکی از مهمترین مشکلات کشت سلول به‌شمار می‌آید.[1] این میکروارگانیسم پلی‌مورف، با اندازه‌ای در حدود ۸۰۰ nm-۳۰۰ و بدون دیواره سلولی می‌باشد و جزو کلاس مولیکوت‌ها و رده‌ی تنریکوت‌ها طبقه‌بندی می‌شود.[2]

آلودگی مایکوپلاسمایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است به‌دلیل اینکه آشکارا در کشت سلول قابل تشخیص نیست و گاهی اوقات با وجود تیتر بالای آلودگی، تغییرات قابل مشاهده‌ای در کشت سلول را موجب نمی‌شود.[3] از اثرات آلودگی مایکوپلاسما در کشت سلول می‌توان به مهار رشد، تغییر در ساخت پروتیین، RNA، DNA، القای ناهنجاری‌های کروموزومی، تغییر در ترکیب غشاء و فرآیندهای غشایی، تقسیم و تمایز سلول‌ها، القا یا سرکوب سایتوکین و بیان فاکتور رشد، افزایش و یا کاهش انتشار ویروس، تخریب اسیدهای نوکلئیک خاص و پیش‌سازهای اسیدهای آمینه و لیپیدها اشاره کرد.[4]

از روش‌های درمان مایکوپلاسما می‌توان به کشت بر روی آگار نرم به‌همراه آنتی‌بیوتیک و روش‌های ایمونولوژیک مانند کشت در حضور آنتی‌سرم‌های اختصاصی و قرار دادن در حضور کمپلمان اشاره

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

کرد.[۵] به‌دلیل تبادل سلول‌ها در آزمایشگاه‌ها خطر گسترش آلودگی از سلول‌های آلوده با رده‌های سالم وجود دارد.[۶] با توجه به اهمیت و کمیاب بودن بعضی از خطوط سلولی و همین‌طور هزینه‌بر بودن کشت دوباره در صورت آلوده شدن آن، در این پژوهش راهکاری ساده و مناسب جهت درمان سلول‌های Vero آلوده به مایکوپلاسما و استفاده از این داده‌ها در فرایندهای پژوهشی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این پژوهش از نوع مطالعات اکتشافی بوده که در مجتمع تولیدات انستیتو پاستور ایران، در آزمایشگاه پژوهش و ساخت واکسن هاری انسانی از آبان ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳ انجام گردیده است. غلظت‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده جهت درمان بر رده سلولی Vero سالم و آلوده (تهیه‌شده از مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران) اثر داده شده تا اثر آنتی‌بیوتیک بر طول عمر و مورفولوژی سلول‌ها بررسی شود.

تعداد یکسانی از سلول‌های Vero در چندین فلاسک کشت سلولی با استفاده از محیط کشت سلولی DMED و FBS ۲۰٪، کشت داده شده و غلظت‌های مختلف از هر آنتی‌بیوتیک به فلاسک‌ها اضافه شد. تعداد سلول‌ها در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شمارش شده و با منحنی رشد سلول سالم در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مقایسه گردیدند. جهت ارزیابی پایداری آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت به‌مدت پنج روز و هر روز یک‌بار از هر رقت از هر آنتی‌بیوتیک نمونه‌گیری شد. جهت کنترل پایداری آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، هر کدام از نمونه‌ها به یک لوله آزمایش حاوی ۱ ml سوسپانسیون تازه تهیه شده که حاوی تعداد قابل شمارش اشریشیاکلی، سوش ATCC است اضافه گردید و در نهایت پایداری آنتی‌بیوتیک در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.[۷و۸]

درمان سلول‌های آلوده به این صورت انجام شد که آنها در پلیت‌های شش یا ۱۲ خانه کشت داده شده و سپس به هر خانه حجمی معین از آنتی‌بیوتیک اضافه شد تا غلظت مورد نظر از آنتی‌بیوتیک در هر چاهک ایجاد شود این کار برای تمامی غلظت‌های

جدول ۱: توالی پرایمرها و شرایط انجام فرایند PCR

توالی پرایمرهای مورد استفاده	
پرایمر اول	'5'-GGCGAATGGGTGAGGTAACACG-3
پرایمر دوم	5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3
شرایط انجام فرایند PCR	
مراحل	**دما** (°C) **زمان** (دقیقه)
واسرشت اولیه	۹٤ ۵
واسرشت	۹٤ ۱
اتصال	٦۰ ۱
گسترش	۷۲ ۱
گسترش نهایی	۷۲ ۱۰

مرحله ٤-۲ به تعداد ۳۸ سیکل تکرار شد.

آنتی‌بیوتیکی انجام گرفت. جهت ارزیابی روند درمان، در هر مرحله از سوپ رویی نمونه‌برداری و عملیات استخراج DNA با روش جوشاندن مطابق دستورکارهای رایج انجام شد.[۹] بررسی وجود و یا عدم وجود مایکوپلاسما بر روی DNA استخراج شده، در حضور پرایمر اختصاصی توسط Polymerase Chain Reaction (PCR) انجام شد (جدول ۱).

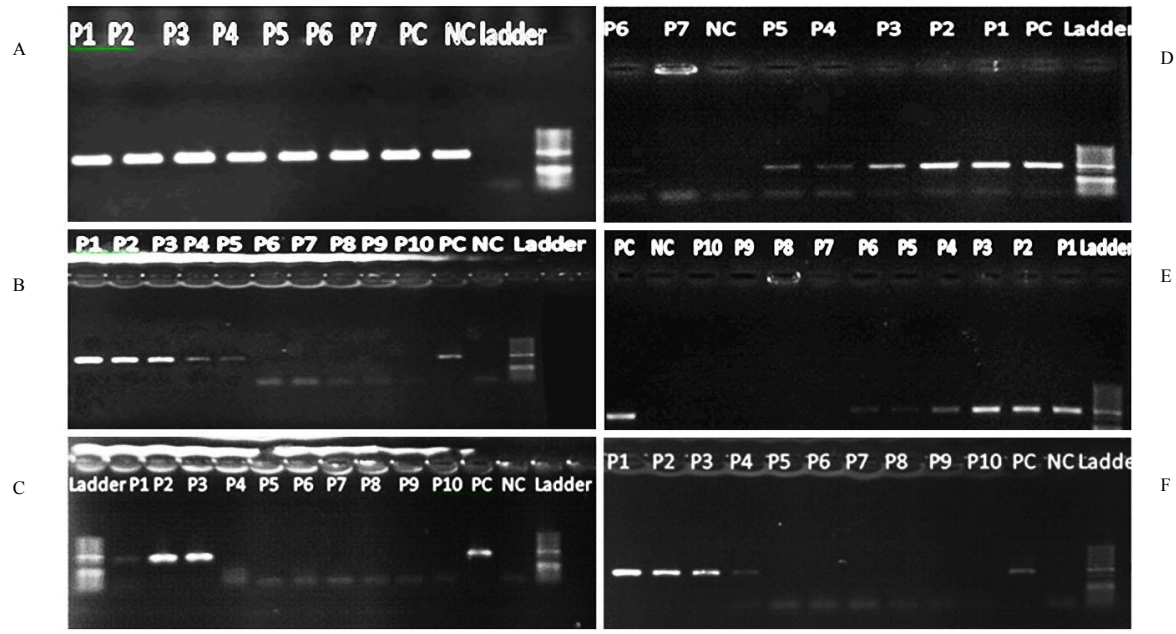
بعد از حذف آلودگی از کشت سلول به‌مدت سه هفته کشت سلولی و پاساژ آنها بدون حضور آنتی‌بیوتیک ادامه یافت و عدم حضور مایکوپلاسما بررسی و ارزیابی گردید. نتایج درمانی با استفاده از روش تاپسیس (Technique for Order of Preference by Similarity to Ideal Solution, TOPSIS) مقایسه شد.[۱۰]

یافته‌ها

در بررسی انجام‌شده، تمام رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین، در مدت پنج روز آزمون در محیط پایدار بودند.

تاثیر سیپروفلوکساسین در درمان مایکوپلاسما بر روی سلول آلوده Vero: سیپروفلوکساسین با رقت‌های ۲، ۲۰ و ۲۰۰ µg/ml در نهایت تا ده پاساژ جهت درمان رده سلولی استفاده شده و وجود و یا عدم وجود مایکوپلاسما با پرایمر طراحی شده و اختصاصی جنس

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR سوپ رویی سلول‌های تحت درمان با سیپروفلوکساسین و انروفلوکساسین: پاساژ (p1-p7) سیپروفلوکساسین µg/ml ۲ (A)؛ پاساژ (p1-p10) سیپروفلوکساسین µg/ml ۲۰ (B)؛ پاساژ (p1-p10) سیپروفلوکساسین µg/ml ۲۰۰ (C)؛ پاساژ (p1-p7) انروفلوکساسین µg/ml ۳ (D)؛ پاساژ (p1-p10) انروفلوکساسین µg/ml ۳۰ (E)؛ پاساژ (p1- p10) انروفلوکساسین µg/ml ۳۰۰ (F).

کنترل مثبت PC، کنترل منفی NC، 100 BP DNA ladder.

مایکوپلاسما بررسی گردید. کشت سلول به گونه‌ای انجام شد که فاصله بین دو پاساژ سه روز باشد. سیپروفلوکساسین با رقت µg/ml ۲ تا هفت پاساژ متوالی (۲۱ روز) تاثیری در درمان نداشته، با رقت µg/ml ۲۰ در پاساژ ششم (۱۸ روز)، و با رقت µg/ml ۲۰۰ در پاساژ چهارم (۱۲ روز) توانست آلودگی با مایکوپلاسما را حذف کند (شکل ۱، A-C). تاثیر انروفلوکساسین در درمان مایکوپلاسما بر روی سلول Vero آلوده: انروفلوکساسین با رقت‌های ۳، ۳۰ و µg/ml ۳۰۰ در نهایت تا ده پاساژ استفاده شد. هر بار قبل از پاساژ از سوپ رویی نمونه‌برداری انجام شده و از نظر وجود مایکوپلاسما با پرایمر اختصاصی جنس مایکوپلاسما بررسی گردید. انروفلوکساسین با رقت µg/ml ۳ تا هفت پاساژ متوالی (۲۱ روز) توانست آلودگی را حذف کند. با رقت µg/ml ۳۰ تا پاساژ هفتم نیز آلودگی حذف شد ولی با رقت µg/ml ۳۰۰ در پاساژ پنجم (۱۵ روز) توانست آلودگی با مایکوپلاسما را حذف کند (شکل ۱، D-F).

بحث

در دهه ۱۹۶۰، مایکوپلاسما به‌عنوان یکی از مهمترین و شایع‌ترین آلودگی‌های کشت‌های سلولی محسوب می‌شد.[۱۲] Kotani و همکارانش درمان با BM-cyclin، 5-Bromouracil، استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی و آگار نرم حاوی آنتی‌بیوتیک را مورد استفاده قرار دادند.[۱۳] در مطالعه انجام‌شده توسط Schmitt، از غلظت‌های ۱، ۱۰، ۲۵ و µg/ml ۵۰، برای حذف هفت گونه مختلف مایکوپلاسما استفاده شد که توانستند آلودگی مایکوپلاسمایی را در مدت زمان ۱۲ روز درمان کنند.[۷]

در مطالعه حاضر سیپروفلوکساسین با غلظت µg/ml ۲۰ در مدت ۱۸ روز و با غلظت µg/ml ۲۰۰ در مدت ۱۲ روز توانست آلودگی را درمان کنند و در مورد انروفلوکساسین غلظت ۳ و µg/ml ۳۰ در مدت ۲۱ روز و غلظت µg/ml ۳۰۰ در مدت ۱۵ روز توانستند آلودگی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

مایکوپلاسمایی را از سلول حذف کنند. با توجه به اینکه مقایسه‌ای بین آنتی‌بیوتیک‌هایی که در زمان‌های یکسان توانستند آلودگی را حذف کنند وجود نداشت از یک روش مقایسه‌ای به‌نام TOPSIS با تکیه بر کمترین رقت آنتی‌بیوتیک و کمترین پاساژی که در آن آلودگی حذف شده است، استفاده شد. بهترین حالت پیشنهادی در واحد زمان برای سیپروفلوکساسین غلظت ۲۰ و ۲۰۰ µg/ml و به‌ترتیب رقت ۳، ۳۰ و ۳۰۰ µg/ml از انروفلوکساسین موثر می‌باشند. به‌علت عوارض بعدی به‌وجود آمدن سویه مقاوم به درمان، از موارد مهم در درمان مایکوپلاسمایی، پرهیز از ایجاد سویه مقاوم به درمان است، Fleckenstein درمان آنتی‌بیوتیکی را در نمونه آلوده انجام داد که میزان مقاومت ایجاد شده با BM-cyclin ۵٪ و با Mycoplasma Removal Agent (MRA) ۲۲٪ و همچنین با سیپروفلوکساسین نیز ۱٤٪ بود که در نهایت توانستند ۷۳٪ آلودگی‌های مزمن را برطرف کنند.[14]

در مطالعه حاضر، سویه مقاوم به درمان مشاهده نگردید و تا دو ماه نیز از نظر عود دوباره آلودگی مورد بررسی قرار گرفت که دلالت بر درمان کلیه سلول‌های آلوده بدون ایجاد سویه مقاوم به درمان دارد. استفاده از یک رژیم درمانی برای کاهش صدمات آنتی‌بیوتیک به سلول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

طبق پژوهشی که توسط Uphoff و همکارش انجام گرفت از سیپروفلوکساسین (یک هفته)، انروفلوکساسین (یک هفته) و MRA (یک هفته) استفاده شد و آلودگی در ۸۵–٦٦٪ کشت‌ها حذف گردید، ولی به‌دلیل سمّیت و اثر نامطلوب آنتی‌بیوتیک، ۱۱–۳٪ کشت‌ها از بین رفتند.[8] در بررسی حاضر، درمان با یک رژیم دارویی و بدون تعویض خانواده آنتی‌بیوتیک صورت گرفته است.

در مطالعه حاضر علاوه‌بر تعیین بهترین دوز درمانی در واحد زمان و عدم ایجاد سویه مقاوم، تعویض آنتی‌بیوتیکی صورت نگرفت و نتیجه درمان نیز به‌روش PCR تایید شد. این پژوهش روی یک رده سلولی انجام شده است و برای استفاده و تعمیم قطعی آن بهتر است در رده‌های سلولی دیگر نیز استفاده و آزمایش گردد.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از طرح ملی ساخت واکسن هاری انسانی مصوب مهرماه ۱۳۹۰ وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی است که در مجتمع تولیدات انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

References

1. Rottem S, Kosower NS, Kornspan JD. Contamination of tissue cultures by mycoplasmas. *Biomed Tissue Cult* 2012:35-58. doi: 10.5772/51518
2. Jung H, Wang SY, Yang IW, Hsueh DW, Yang WJ, Wang TH, et al. Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. *Chang Gung Med J* 2003;26(4):250-8.
3. Gignac SM, Uphoff CC, MacLeod RA, Steube K, Voges M, Drexler HG. Treatment of mycoplasma-contaminated continuous cell lines with mycoplasma removal agent (MRA). *Leuk Res* 1992;16(8):815-22.
4. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 2003;83(2):417-32.
5. Uphoff CC, Drexler HG. Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol Biol* 2011;731:105-14.
6. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum Cell* 1999;12(4):229-36.
7. Schmitt K, Däubener W, Bitter-Suermann D, Hadding U. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods* 1988;109(1):17-25.
8. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002;38(2):86-9.
9. Pitcher D, Saunders N, Owen R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989;8(4):151-6.
10. Yue Z. A method for group decision-making based on determining weights of decision makers using TOPSIS. *Appl Math Modell* 2011;35(4):1926-36.
11. Uphoff CC, Denkmann S-A, Drexler HG. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. *J Biomed* Biotechnol 2012;2012. doi:10.1155/2012/267678
12. Taylor-Robinson D, Addey JP, Goodwin CS. Comparison of technics for the isolation of T-strain mycoplasmas. *Nature* 1969;222(5190):274-5.
13. Kotani H, Butler G, Heggan D, McGarrity GJ. Elimination of mycoplasmas from cell cultures by a novel soft agar technique. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991;27A(6):509-13.
14. Fleckenstein E, Drexler HG. Elimination of mycoplasma contamination in cell cultures. *Biochemica* 1996;1(1):48-51.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2015; Vol. 72, No. 11: 794-798 Brief Report

Mycoplasma contamination in cell cultures treated with ciprofloxacin and enrofloxacin: *brief report*

Bita Soltanian M.Sc.[1]
Shiva Irani Ph.D.[1]
Sarvenaz Hashemi M.Sc.[2]
Seyed Hamid Reza Mozhgani M.Sc.[2,3]
Mehdi Ajorloo M.Sc.[2]
Yoosef Cheraghi B.S.[4]
Alireza Gholami Ph.D.[2,5*]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Human Rabies Vaccine Laboratory, Pasteurs Production and Research Complex, Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Department of Virology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Recombinant Hepatitis B Vaccine Production, Pasteurs Production and Research Complex, Institute of Iran, Tehran, Iran.
5- WHO CC For Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

* Corresponding author: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Iran Pasteur Institute, 12 Farvardin St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66403496
E-mail: agholami@pasteur.ac.ir

Abstract

Received: 31 Aug. 2014 Accepted: 03 Dec. 2014 Available online: 09 Feb. 2015

Background: Mycoplasma contamination in cell cultures is considered as a major economic, research and production problem. In this study, mycoplasma-infected Vero cell lines were treated by various dilutions of ciprofloxacin and enrofloxacin in a timely manner. Removal of mycoplasma contamination from infected cell cultures was evaluated and demonstrated by polymerase chain reaction (PCR) method.

Methods: This study was done from October 2013 to May 2014, in Human Rabies Vaccine Laboratory, Pasteur Institute Production and Research Complex, Tehran, Iran. Different dilutions of ciprofloxacin and enrofloxacin were used in sequential passages for treatment of infected Vero cell line. Based on lowest passages of the cell line, antibiotic treatment with ciprofloxacin and enrofloxacin was done. Amelioration of the infection and removal of mycoplasma contamination was confirmed in each step by PCR method. The technique for order of preference by similarity to ideal solution, TOPSIS method, was used to suggest the most efficient concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin.

Results: Proposed concentration of ciprofloxacin is 20 µg/ml, and in the second order is 200 µg/ml. For enrofloxacin the best proposed concentrations are 30, 300 and 3 µg/ml respectively. Ciprofloxacin and enrofloxacin and ability of them for removal of mycoplasma and also the time of treatment were verified by evaluation of the recurrence of infection through consecutive subcultures of the treated cell line.

Conclusion: Our results showed that 20 µg/ml of ciprofloxacin was the dilution of choice for mycoplasma elimination followed by 200 µg/ml of ciprofloxacin. Concentrations of 3, 30 and 300 of enrofloxacin, respectively, are appropriate for mycoplasma removal. More detailed works would be needed to verify the authenticity of the proposed simple and affordable way of mycoplasma elimination.

Keywords: Cell culture techniques, ciprofloxacin, enrofloxacin, mycoplasma, polymerase chain reaction.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]