

HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE MYCOPLASMA KONTAMİNASYONU

Aydın Karaarslan* • Murat Özsan*

ÖZET

Hücre kültürleri araştırmalarda, aşı üretiminde ve bazı hastalıkların tanısında başvurulan bir yöntemdir. Hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu yaygındır ve hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozan ciddi bir sorundur. Bu derlemede, kontaminasyonun saptanması için kullanılan çeşitli yöntemler gözden geçirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, Mikoplazma, Kontaminasyon, Tanı

SUMMARY

Mycoplasma Contamination in Cell Culturs

Cell culture is a method used in research, vaccine production and diagnosis of some diseases. Mycoplasma contamination of cell cultures is widespread and is a major problem destroyed of cellular physiology and metabolism. In this article, the various methods used for detection of contamination have been reviewed.

Key Words: Cell culture, Mycoplasma, Contamination, Diagnosis

Hücre kültürlerinin kontaminasyonu hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozarak, araştırmaların ve endüstriyel çalışmaların verimliliğini olumsuz yönde etkilemekte, hastalıkların tanılarının doğru bir şekilde konulmasını engellemektedir. Ayrıca virus aşılarının hazırlandığı hücre kültürlerindeki kontaminasyon, insan sağlığı açısından ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (1,2).

Hücre kültürlerinde, ilk kontaminan mikoplazma izolasyonu Robinson ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (3). Bu araştırmacılar mikoplazmaların hücre kültürleri üzerine etkilerini araştırırken, mikoplazma inoküle etmedikleri negatif kontrol hücre kültürlerinde de mikoplazma varlığını tespit etmişlerdir. Daha sonraki yıllarda polio virus aşısı için hazırlanan primer hücre kültürlerinde de mikoplazma kontaminasyonunun tespit edilmesinden sonra, virus aşıları ve hücre kültürlerinin rutin kontrolleri yapılmaya başlanmıştır (4). Çeşitli ülkelerde devamlı hücre kültürlerinin %15-65'inde mikoplazma kontaminasyonu gösterilmiştir (5,6). Hücre kültürlerini en sık sığır mikoplazmaları (*M. arginini*, *M. pirum*, *M. bovis*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. bovoculi*), ikinci sıklıkta insan mikoplazmaları (*M.*

hominis, *M. fermentans*, *M. salivarum*) kontamine etmekte, bunları sırasıyla domuz mikoplazmaları (*M. hyorhina*, *A. oculi*), kuş, kanatlı kümes hayvanları ve kedilerde hastalık yapan mikoplazmalar (*M. arthritis*, *M. pulmonis*, *M. canis*) izlemektedir (7). Kontaminasyon genellikle hücre üremesinin olduğu dönemde ve eksojen kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır. Kontaminasyonlarda 20 farklı *Mycoplasma* ve *Acholeplasma* türü izole edilmiştir. Bunların %95'i *M. orale*, *M. arginini*, *M. hyorhina*, *M. fermentans* ve *Acholeplasma laidlawii*'dir. Tespit edilen mikoplazma türlerinin sıklığı bir çok çalışmada farklı olabilmekte ve birden fazla mikoplazma türüyle kontaminasyona da rastlanmaktadır. Kontaminasyon normal, virüsle infekte, transforme ya da neoplastik monolayer ve/veya süspanse durumda olan her türlü hücrede olabilmekte ve primer hücre kültürlerinde, devamlı hücre kültürlerinden daha az oranda görülmektedir (5).

Kontaminasyon Kaynakları

Uzun yıllar, mikoplazma ile kirlenmiş olan sığır serumlarının kullanılması hücre kültürlerinin en önemli kontaminasyon kaynağı olmuştur. Bugün fir-

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

malar tarafından hazırlanan ticari sığır serumlarının mikoplazma yönünden denetlenmesi bu kaynağın büyük oranda ortadan kalkmasına yol açmıştır. Günümüzde en önemli kontaminasyon kaynakları, laboratuvardaki kontamine laboratuvar araç gereçleri ve besiyerleri, nadir olarak virüs havuzu ya da monoklonal antikordardır (4). Laboratuvar personelinin de hücre kültürlerini kontamine ettiği görülmektedir. Örneğin boğazında M. arginini taşıyan bir laboratuvar teknisyeninin sığır böbrek monolayer hücre kültürünün kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (8).

Hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonunun gösterilmesi

Bu işlem ya örneklerin katı, yarı katı ve sıvı besiyerlerine ekilerek mikoplazmaların üretilmesini amaçlayan kültür yöntemleriyle, ya da kültürü zor olan bazı mikoplazma suşlarının DNA boyası, elektron mikroskobu ve immünofloresans gibi yöntemlerle gösterilmesiyle yapılır (9).

Kültür Yöntemleri

Tüm dünyada çeşitli laboratuvarlar mikoplazma izolasyonunda birçok besiyeri formülasyonları ve çeşitli kültür işlemlerini başarılı bir şekilde uygulamaktadırlar. Besiyeri formüllerinin çok önemli olmasının yanısıra standardizasyonun da iyi yapılması gereklidir. Rutin olarak kullanılan besiyerleri, temel bir sıvı ya da agar besiyerine serum ve diğer ek maddelerin konulması ve üremenin optimal olarak sağlandığı konsantrasyonların belirlenmesi ile hazırlanmaktadır (10).

a-Katı ve sıvı besiyerleri: Mikoplazmaların izolasyonunda çeşitli formülasyonlarda besiyeri kullanılmaktadır. Hazırlanan bu besiyerine mikoplazmaların daha iyi üreyebilmesi amacıyla, at serumu, taze hazırlanmış maya ekstresi, arginin ya da dekstroza, timik DNA, vitaminler ve indikatör olarak da fenol kırmızısı eklenmektedir. Bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi için de besiyerine penisilin konulmaktadır (11).

Hücre kültürü inoküle edilen besiyerleri, 37°C'de, %5 CO₂'li ve %95 azot içeren ortamda en az üç hafta izlenir. Hücre kültürlerinin mikoplazma ile kontamine olduğu, üreyen bakterinin sıvı besiyerinde renk değişimi meydana getirmesinin, katı besiyerinde ise koloni oluşturmasının görülmesiyle anlaşılır (7).

b- Yarı katı besiyeri: Bu besiyerleri, arginini kullanan mikoplazmaların izolasyonunda sıvı besiyerlerinden daha duyarlıdır. Mikoplazmalar burada bulanıklık meydana getiren mikrokoloniler oluşturabilirler. Arginini kullananlar alkali, şekerleri fermente

edenler ise asit ortam meydana getirirler. Böylece pH değişikliği ve bulanıklık gözle görülerek üreme tespit edilmiş olur (4).

Kültür dışı yöntemler

Hücre kültürlerini kontamine eden ve kültürü yapılamayan mikoplazmaların %70'ini M. hyorhisis'in oluşturduğu gösterilmiştir (12). Kültürü yapılamayan bir mikoplazmanın tespiti ve tür ayrımı için hücre kültür sistemleri, DNA ve immünofloresan boyama yöntemleri, elektron mikroskobu, ELISA, nükleik asid reaksiyonu, polimerase chain reaction (PCR) gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (9). Bunlardan başlıcaları aşağıda gözden geçirilmiştir. Bu işlemlerle genellikle hücrelere tutunan mikoplazma suşları tespit edilmektedir.

a- Hücre kültür sistemleri: Bunlardan birisi olan indikatör hücre kültür yönteminde Vero ya da NIH 3T3 gibi hücre kültür dizileri kullanılmaktadır. Mikoplazmaların varlığı, tutunduğu hücrelerde tipik sitopatik etkinin tespit edilmesiyle, nonspesifik DNA boya ile veya immünofloresan gibi spesifik boyalarla hücre membranına tutunan mikoplazmaların gösterilmesiyle ortaya konmaktadır (13).

Mikoplazma ile kontamine olan hücre kültürlerinin gösterilmesi için bisbenzimidazole (Hoechst No: 33258) DNA boyama yöntemi geliştirilmiştir (14). Bu, hücreye tutunma özelliğinde olan mikoplazmaların gösterilmesinde en etkili, basit ve ucuz nonspesifik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (12,15).

Diğer DNA boyama yöntemleri, 4-6 diamidino-phenylindole (DAPI) boyası, olivomycin fluorescent boyası, konjuge benzoxazinone kanamycin floresan boyasıdır (16-28).

Klasik olarak kullanılmakta olan histolojik boyalardan hematoksin eozin, Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, hypotonic orcein ve acridine orange floresan boya ile infekte hücre kültürlerinde mikoplazmaları tespit etmek için kullanılmıştır. Boyalı preparatlarda mikoplazmalar küçük, mikroskobik beneklenmeler şeklinde hücre membranında birikmiş olarak tespit edilir. Bu boyalar, yalnızca hücrelere tutunan mikoplazmaların gösterilmesinde etkili olmaktadır (19).

İmmünofloresan boyama, türe özgül antikorun floresan boya ile konjuge edilerek hücre kültürlerinde kontaminasyonunun hızlı bir şekilde ortaya konulmasını sağlayan bir yöntemdir. Spesifik immünofloresan boyama, primer olarak mikoplazmaların tür ayrımının yapılmasında kullanılmaktadır (20).

b- Elektron Mikroskobu: Elektron mikroskobu özellikle mikoplazma-hücre etkileşimini incelemek

için yararlıdır. *M. pulmonis* gibi bazı mikoplazmaların hücre membranına tutunmalarıyla oluşan başlangıç enfeksiyona ait en erken belirtiler elektron mikroskopuyla tespit edilebilmektedir (7).

c- Kimyasal ve enzimatik yöntemler: Bu inceleme yöntemleri mikoplazmalarda bulunan arginin deaminaz, timidin, üridin, adenozin fosforilaz, hipoksantin ya da urasil fosforibosil transferaz gibi enzimlerin aktivitelerinin tespit edilmesi temeline dayanmaktadır. Bunlardan tanı değeri en yüksek olan adenozin fosforilaz aktivitesidir (21). Mc Garrity ve ark (5) mikoplazma ile kontamine hücre kültürlerinde ortaya çıkan ve toksik bir metabolit olan 6-methyl purine deoxyriboside (6-MPDR)'in tespit edilmesiyle yeni bir tanı yöntemini geliştirmişlerdir.

Gabridge ve ark. (22) genel hücre kültürlerinde mikoplazmaların tespit edilmesinde ve türlerin tanımlanmasında enzyme immunosorbent assay kullanmışlardır.

KAYNAKLAR

1. Mattson JG, Johansson KE. Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 107: 139-44.
2. Rotten S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 1993; 11: 143-51.
3. Robinson LB, Wichelhausen RH, Roizman B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumoniae-like organisms. *Science* 1956; 124: 1147-48.
4. Barile MF, Rottem S. Mycoplasmas in cell culture. In: *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas FEMS Symposium No: 62*. Kahane I, Adoni A, eds. New York: Plenum Press, 1993; 155-88.
5. McGarrity GJ, Kotani H. Pathogenesis of mycoplasma diseases. In: *The Mycoplasmas, Vol. IV*, Razin S, Barile MF, eds. New York: Academic Press 1985; 353-90.
6. Coronato S, Coto C. Mycoplasma contaminating tissue cultures. *Rev Argent Microbiol* 1987; 4: 165-72.
7. Barile MF. Mycoplasma-tissue cell interactions. In: *The Mycoplasmas, Vol. II*. Tully JG, Whitcomb, eds. New York: Academic Press, 1979; 425-74.
8. Pftzner H, Otto P. Detection of mycoplasma contamination in primary calf kidney cell cultures. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1992; 277: 4953.
9. Uphoff CC, Gignac SM, Drexler HG. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *J Immunol Methods* 1992; 149: 43-53.
10. Razin S, Tully JG. *Methods in Mycoplasmaology, Vol. I*. New York: Academic Press, 1983; 1-504.
11. Barile MF, DelGiudice RA, Grabowski MW, Hopps HE. Media for isolation of mycoplasmas from biologic materials. *Develop Biol Standard* 1974; 23: 128-33.
12. DelGiudice RA, Hopps HE. Microbiological methods and fluorescent microscopy for the direct demonstration of mycoplasma infection of cell cultures. In: *Mycoplasma Infection of Cell Cultures*. McGarrity GJ, Murphy D, Nichols WW, eds. New York: Plenum Press, 1978; 57-69.
13. McGarrity GJ, Barile MF. Use of indicator cell lines for recovery and identification of cell culture mycoplasmas. In: *Methods in Mycoplasmaology Vol. II*. Tully JG, Razin S, eds. New York: Academic Press, 1983; 167-72.
14. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977; 104: 255-62.
15. Battaglio M, Pozzi D, Grimaldi S, Parasassi T. Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching. *Biotech Histochem* 1994; 69: 152-6.
16. Russel WC, Newman C, Williamson DH. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature* 1975 253: 461-2.
17. Monsigny M, Midoux P, Depierreux C, Bebear C, Le Bris MT, Valeur B. Benzoxazinone kanamycin A conjugate. A new fluorescent probe suitable to detect mycoplasmas in cell culture. *Biol Cell* 1990; 101-5.

d- Nükleik asid hibridizasyonu ve PCR: Hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonu DNA-rRNA ve direkt filtre hibridizasyon (1,23) ve PCR ile duyarlı, özgül ve daha hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir (24,25).

Kontaminasyonun saptanmasında seçilecek yöntemin belirlenmesi için kültür, immünofloresan, nükleik asid hibridizasyon, ELISA, 6-MPDR, PCR ve DNA boyası gibi yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, hız, fiat, yetiştirilmiş eleman ve araç gereç bağımlılığı gibi parametreleri göz önüne alınarak yapılan karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda; hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonunun ortaya konması için önce, bisbenzimidazole gibi nonspesifik bir boya yönteminin uygulanması ve daha sonra mikoplazma türünün tanımlanması için de spesifik immunofloresan boyama yöntemine başvurulmasının en pratik ve uygun yol olduğu gösterilmiştir (4,9,26).

18. Polster U. Fluorescent dye demonstration of mycoplasma in cell cultures using olivomycin. Arch Exp Veterinarmed 1986; 40: 142-6.
19. Ebke J, Kuwert E. Detection of Mycoplasma orale type I tissue cultures by means of the acridine orange stain. Zentralbl Bakteriol 1972; 221: 87-93.
20. Rose FV, Barile MF, Cebra JJ. Monoclonal antibodies as probes for antigens of Mycoplasma pulmonis. ad Exp Med Biol 1983; 162: 319-26.
21. Levine EM, Müller SN. Biochemical procedures for the detection of mycoplasma infection in cell cultures. In: Methods in Mycoplasmaology. Vol. II Tully JG, Razin S, eds. New York: Academic Press, 1983; 191-208.
22. Gabridge MG, Lundin DJ, Gladd MF. Detection and speciation of common cell culture mycoplasmas by an enzyme-linked immunosorbent assay with biotin-avidin amplification and microporous membrane solid phase. In Vitro Cell Dev Biol 1986; 22: 491-98.
23. Johansson KE, Johansson I. Evaluation of different hybridization procedures for the detection of mycoplasma contamination in cell cultures. Mol Cell Probes 1990; 4: 33-42.
24. Hopert A, Uphoff CC, Wirth M, Hauser H, Drexler HG. Mycoplasma detection by PCR analysis. In vitro Cell Dev Biol Anim 1993; 29: 819-21.
25. 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; 78: 89-94.
26. Van Kuppefeld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, Van Der Logt JT, Melchers WJ. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 149-52.