

## HÜCRE KÜLTÜRLERİNDEKİ MYCOPLASMA KONTAMİNASYONLARININ FLUORESCENSE (DAPI) VE ACETO-ORCEİN BOYAMA YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ ÇALIŞMALARI

S. İsmet GÜRHAN (1)

Aysun ÖZTÜRKMEN (2)

### G İ R İ Ş

Mikoplazmalar, canlı bir hücre olmaksızın vasatlarda üreyebilen en küçük mikroorganizmalardır. Hücre kültürlerinin mikoplazma ile enfekte olduğu ilk olarak Robinson (Robinson, L.B., et, 1956) tarafından bildirilmiştir.

Doku kültüründe veya embriyolu yumurtada hazırlanan canlı virus aşılı mikoplazmalar ile kontamine olabilir. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bu aşılı ve bu amaçla kullanılan doku kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu yönünden test edilmelerini şart koşmaktadır (3, 12).

Genelde mikoplazmalar mikrobiyolojik kültür ortamlarında üretilebilir ise de M.hyorhins gibi bazı türlerin üretimi zordur. Doku kültürlerine adapte mikoplazmaların her zaman agar-buyyon kültürlerinde tespitinin mümkün olmadığı, bu tekniklerle negatif sonuç veren birçok kültürün gerçekte çeşitli mikoplazma türleri ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (9). Kontaminantın türü bilinmediği için herhangi bir biyokimyasal test veya immunfloresan tekniğinden ya-

---

Bu proje T.O.K. Bakanlığı K.K. Gen. Md. Araştırma Dairesi desteği ile yürütülmüştür (KKGA-HS-10-V-05)

(1) Uzm. Vet. Hek., Şap Ens., Hücre Kontrol ve Geliştirme Lab. Şefi, P.K. 714, 06044 Ankara-TÜRKİYE

(2) Uzm. Vet. Hek., Şap Ens. Hücre Kontrol ve Geliştirme Lab.

rarlanılamamaktadır. Bu nedendir ki araştırmacılar rutin laboratuvar çalışmaları için süratli ve güvenilebilir bir teşhis metodu bulma yolunda birçok çalışma yapmışlardır.

İndikatör hücre kültürlerine şüpheli hücrelerden ekimler yaparak etkenin canlı ortamlarda üremesinin temini ve bu üremenin çeşitli boyama metotları ile tespiti en güvenilir ve kısa zamanda sonuç veren yöntemlerdir (2, 5). Her ne kadar son yıllarda araştırmacılar florokrom boya tercih ettiklerini bildiriyorlar ise de, bu metodun Fogh'un (Fogh, J., 1965) bildirdiği aceto-orcein ile boyama metoduna üstünlüğü kesin olarak belirlenmemiştir.

Bu çalışmada doku kültürü ve aşı üreten laboratuvarlar için en uygun ve duyarlı metodun belirlenmesi amaçlanmaktadır.

### MATERYAL ve METOT

**HÜCRE :** İndikatör hücre olarak mikoplazmadan ari Vero (African green monkey) ve FL Transformed human amnion) devamlı hücre kültürleri kullanılmış ve gene laboratuvarımız stoklarında mevcut IBRS<sub>2</sub> An<sub>2</sub>, FL, Vero, BHK21 An<sub>30</sub>, BHK21 An<sub>31</sub>, BHK21 An<sub>34</sub> devamlı hücre kültürleri ile HPLF (human periodontal ligament fibroblast) ve HGF (human gingival fibroblast) primer hücre kültürleri kullanılmıştır.

**MİKOPLAZMA SUŞLARI :** Liyofilize M. orale, M. hyorhinis ve M. arginini suşları testlerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**ORCEİN :** Merck Art. 7091. Glacial acetic acid içerisindeki % 2' lik solüsyonu kullanılmıştır.

**4-6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE-2 HCl (DAPI) :** Serva Cat. No. 18860. Distile su içerisindeki 0,1 µg/ml final solüsyonu kullanılmıştır.

**HÜCRE KÜLTÜRÜ VASATLARI :** Vero, FL, HPLF ve HGF hücreleri için Dulbecco-MEM, IBRS<sub>2</sub> hücresi için MEM, BHK<sub>21</sub> hücreleri için de Glasgow-MEM, % 10 inaktif FCS ilavesi ile kullanılmıştır.

### M E T O T

I — Aceto-Orcein ile boyayarak mikoplazma aranması işlemi Fogh'un (Fogh, J. and Fogh, H., 1965) bildirdiği yöntem ile uygulanmıştır.

II — İndikatör hücre kullanarak uygulanan direkt floresan tekniği Russel'in (Russel, W.C., et al, 1975) bildirdiği yöntem ile uygulanmıştır.

III — İndikatör hücre kullanmaksızın direkt floresan tekniği, Precious'un (Precious, B., Russel, W.C., 1987) bildirdiği yöntem ile uygulanmıştır.

IV — Hücre kültürlerinde mikoplazma testleri üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir :

1 — İndikatör hücre kullanarak stoklardaki hücre suşlarında mikoplazma taraması : Burada indikatör hücre olarak Fogh'un metodu için FL, Russel'in metodu için de Vero hücre kültürleri kullanılarak Vero, FL, IBRS<sub>2</sub> An<sub>2</sub>, BHK21 An<sub>13</sub>, BHK21 An<sub>14</sub>, BHK21 An<sub>30</sub>, BHK21 An<sub>31</sub>, BHK21 An<sub>34</sub>, HPLF ve HGF hücre kültürlerinde mikoplazmaların varlığı araştırılmıştır.

2 — Mikoplazmadan ari olduğu tespit edilen hücre kültürlerine eşit miktarlarda mikoplazma suşları ekerek iki boyama yönteminin karşılaştırılması : Lyofilize mikoplazma suşlarının her ampul 10 ml G-MEM içinde dilue edilmiş ve yeni hazırlanmış hücre kültürlerine (lamelli Leighton tüpleri) 0,05 ml miktarlarda taksim edilmiştir. 72 saat % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 hava ihtiva eden ortamda 37°C'de inkube edildikten sonra kültürler aceto-orcein ve DAPI ile boyanmıştır. Mikoplazma ekimi sırasında her hücre kültürü için 2 negatif kontrol kullanılmıştır.

3 — İki boyama yönteminin duyarlılıklarının karşılaştırılması: Birinci aşamada mikoplazma ile kontamine olduğu tespit edilmiş olan BHK21 An<sub>14</sub> hücre kültürü 24 saat 37°C'de inkube edildikten sonra üzerindeki kullanılmış üretime vasatının Dulbecco-MEM ile 1/10 ve 1/100 dilusyonları yapılmıştır. Her hücre türü ve dilusyon için 10 adet lamelli Leighton tüpü kullanılarak mikoplazmadan ari Vero, FL ve BHK An<sub>30</sub> hücre kültürleri hazırlanmıştır. 72 saat inkubasyondan sonra kültürler aceto-orcein ve DAPI ile boyanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

V — Mikrofotografi : Boyamalar sonunda tespit edilen müsbet ve menfi kültürlerin fotoğrafları çekilmiştir. Morfolojik inceleme için Olympus BH ışık mikroskobu, 40 x 15 büyütmede immersion objektifi ile kullanılmıştır.



## BULGULAR

1 — İndikatör hücre kullanarak mikoplazma kontaminasyonlarının tespiti : Laboratuvarımız stoklarında mevcut hücre kültürlerinin indikatör hücre kullanarak yapılan mikoplazma taramasında bunlardan BHK21 An<sub>14</sub> ve BHK21 An<sub>34</sub> suşlarının gerek aceto-orcein gerekse DAPI ile boyamada mikoplazma ile kontamine oldukları BHK21 An<sub>13</sub> suşunun aceto-orcein boyamasında negatif, DAPI ile boyamada pozitif sonuç verdiği, diğer hücre suşlarının ise her iki yöntemde de negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Tablo I).

2 — Mikoplazmadan arı olduğu bilinen hücre kültürlerine eşit miktarlarda mikoplazma suşu ekildikten sonra yapılan boyamalar neticesinde M.hyorhins ekilmiş Vero hücresinde ve M. orale ve M. arginini ekilmiş BHK21 An<sub>30</sub> hücresinde aceto-orcein ile boyama sonucu herhangi bir kontaminasyon görülmezken diğer tüm kültürlerde mikroskop sahasında değişen yoğunluklarda etken tespit edilmiştir (Tablo II).

3 — Mikoplazma müsbet hücre kültürüne (BHK21- An<sub>14</sub>) ait üretme vasatının 1/10 ve 1/100 oranlarındaki dilusyonlarının mikoplazmadan arı Vero, FL ve BHK21 An<sub>30</sub> hücre kültürlerine ekimi sonucu yapay olarak oluşturulan kontaminasyonlar, DAPI ile boyamada her iki dilusyon için 5/5 oranında gözlenebilirken aceto-orcein ile boyamada Vero hücresinde 1/10 dilusyonda 5/5, 1/100 dilusyonda 1/5, FL hücresinde 1/10 dilusyonda 5/5, 1/100 dilusyonda 3/5. BHK21 An<sub>30</sub> hücresinde 1/10 dilusyonda gene 5/5, 1/100 dilusyonda 0/5 oranlarında gözlenebilmiştir (Tablo III).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Enfekte hücre kültürlerindeki mikoplazmaları tespit etmek amacıyla birçok teknik geliştirilmiştir. Bunlar mikrobiyolojik, radioisotopik ve enzimatik yöntemlerdir. Dikkatli yapılan direkt mikrobiyolojik testler ile hücre kültürlerindeki tüm mikoplazma kontaminasyonlarının tespit edilebileceği inancı, sonraları birçok M.hyorhins türlerinin hücre olmayan ortamda üremediğinin kesin olarak anlaşılması ile yıkılmıştır (4). Bu buluşlardan sonra indirekt teşhis metodları önem kazanmıştır.

İndirekt teşhis metodları, bir indikatör hücre kullanılarak uygulanabileceği gibi, doğrudan şüpheli kültürün uygun bir boya ile bo-

yanması ile de uygulanabilir (5). Araştırmacılar, floresan boyama tekniği ile mikoplazma kontaminasyonlarının saptanmasında indikatör hücre kültürü kullanımını rutin uygulamadan kaldırılabileceğini bildirmişlerdir (6, 8). Bu çalışmada da laboratuvarımız stoklarında mevcut Vero ve FL hücre kültürleri indikatör olarak kullanılmış ve müsbet kültürlerde floresan tekniği ile etken kolaylıkla tespit edilebilmiştir. Ancak indikatör kullanarak ya da kullanmaksızın yapılan tetkiklerde teşhis yönünden bir fark gözlenmemiştir. Bu da Mowels (Mowels, J.M., 1989) ve Precious'un (Precious, B. ve Russel, W.C. 1987) bulgularını kanıtlamaktadır.

Mikoplazmaların teşhisi için birçok boyama yöntemi uygulanmaktadır. Bunlar arasında Fogh'un (Fogh, J. ve Fogh, H., 1965) aceto-orcein ile boyama yöntemi en eskilerinden biridir. Boyanın ısıya ve ışığa duyarlı olmaması, preparatların adi ışık mikroskobu ile incelenebilmesi gibi avantajları olan bu yöntem ile yapılan denemelerde zaman zaman, özellikle düşük konsantrasyonlarda mikoplazma ihtiva eden kültürlerde hatalı negatif sonuçlar alınmıştır (Tablo III).

Mikoplazmaların DNA ihtiva etmesinden yararlanılarak birçok DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar teşhis amacıyla kullanılmaktadır. Bunlar arasında 2,2-(4-hydroxyphenyl)-6-benzimidazolyl-6-(1-methyl-4-piperazil) benzimidazol, kısa adıyla Hoechst 33258 ve 4,6-diamidino-2-phenylindole, 2HCl, kısa adı ile DAPI en yaygın olarak kullanılanlarıdır. Preparatlarda sadece floresan veren hücre nükleusu ve ekstrasellüler bölgelerde mikoplazmal DNA gözlenir. DAPI ile Hoechst 33258'in benzer sonuçlar verdiği (10) ancak Hoechst 33258'in DAPI'ya göre ısıya ve ışığa daha fazla hassas olduğu bildirilmektedir (5). Bu çalışmada da floresan boya olarak DAPI kullanılmış ve preparatların 1 ay kadar özelliğini kaybetmeksizin karanlıkta muhafaza edilebildiği gözlenmiştir.

Mc Garrity (Mc Garrity, G.J., et al, 1983), M.hyorhinitis'in cytdorsorbsiyonunun çok kuvvetli, M.oralis'in ise çok zayıf olduğunu bildirmiştir. Bu nokta gözönüne alınarak bu çalışmada da şahit olarak cytdorsorbsiyonun alt ve üst limitlerindeki sözü edilen iki suş ile doku kültürlerinde oldukça sık karşılaşılan bir suş olan M.arginini kullanılmıştır.

Bazı araştırmacılar, hücre kültürlerinde mikoplazma aranması amacıyla floresan DNA boya kadar Fogh'un aceto-orcein boyama tekniğinin de kullanılabileceğini (5), bazıları ise bu tekniğin ancak



$10^3$  -  $10^4$  CFU'e kadarki mikoplazma kontaminasyonlarını saptayabildiğini bildirmişlerdir (11). Bu çalışmada da mikoplazmaların ortamda düşük konsantrasyonlarda bulunmaları halinde aceto-orcein boyama tekniği ile tespit edilmelerinin zor olduğu ortaya çıkmıştır (Tablo III).

İlk bakışta süratli ve kesin teşhis için en uygun yöntem olarak görülen DAPI boyama tekniğinin uygulanmasında da yanlış pozitif ya da negatif reaksiyonların gözlenmesi mümkündür. Örneğin, çok yoğun hücre konsantrasyonu ile başlanan kültürlerde hatalı pozitif reaksiyon gözlenebilir, bazı M. orale suşları tespit edilemeyebilir (7), lymphoblastoid ve bazı transforme hücreler gibi birtakım mikoplazmadan arı hücre kültürleri zeminde nonspesifik reaksiyon verebilirler (4).

Bu çalışmada elde edilen bulgular ve önceki araştırmacıların yayınları gözönüne alınarak denilebilir ki, hücre kültürlerinde mikoplazmaların aranması amacı ile floresan DNA boyama yöntemi mutlak uygulanması gereken ve süratle sonuç alınabilen bir yöntemdir. Ancak sonucu teyit etmek açısından bir başka boyama yöntemi (ki bu Fogh'un tekniği olabilir) veya eğer zaman ve laboratuvar şartları müsaitse, mikrobiyolojik testleri (PPLO agar-buyyon kültürleri) uygulamakta yarar vardır.

## Ö Z E T

Hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonlarının tespiti için kullanılan aceto-orcein ve floresan DAPI ile boyama yönteminin bazı özellikleri karşılaştırmalı olarak incelendi: 1 — Laboratuvarımız stoklarında mevcut hücre kültürleri bu iki metot ile test edildi; 2 — Birinci aşamada mikoplazmadan arı oldukları tespit edilen hücre kültürlerinden üçü üç ayrı mikoplazma suşu ile kontamine edildi ve gene sözkonusu iki metot ile test edildiler; 3 — Mikoplazmadan arı Vero, FL ve BHK21 An<sub>30</sub> hücre kültürleri, kontamine olduğu birinci aşamada tespit edilmiş olan BHK21 An<sub>14</sub> hücre kültürünün vasatı ile ayrı ayrı 1/10 ve 1/100 dilasyonlarda enfekte edildi ve iki metotla test edildiler.

Sonuçta, floresan DAPI boyama yönteminin aceto-orcein boyama yöntemine nisbetle daha duyarlı olduğu tespit edildi. Ancak, literatürde bildirilen bazı hatalı pozitif ve negatif reaksiyonların varlığı gözönüne alınarak, daha başarılı sonuç almak için iki yöntemin beraberce kullanılması tavsiye edildi.

## S U M M A R Y

Some aspects of the detection of mycoplasma contaminations in cell cultures both by fluorescent DAPI stain and aceto-orcein stain have been studied comperatively: 1 — The cell cultures already present in our laboratory's stocks have been tested by those two methods. 2 — Three of mycoplasma-free cell cultures tested in the first step have been artificially infected with three different mycoplasma strains and stained by two techniques comperatively; 3 — Mycoplasma-free Vero, FL and BHK21 An<sub>30</sub> cell cultures have been infected with the medium of mycoplasma contaminated BHK21 An<sub>14</sub> cell culture in two different dilutions (1/10 and 1/100) and after 24 hours of incubation stained with two methods separetely.

As a result, fluorescent DAPI staining assay has been estimated more sensitive than aceto-orcein staining. However by taking into concideration some false positive and negative reactions mentioned in the literature, the combination of two techniques has been advised for more satisfactory detection.

## T E Ş E K K Ü R

Bizlere bu çalışmayı yapma fırsatını veren Bakanlık Araştırma Dairesi'ne ve Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — CHEN, T.R., (1977) : In situ Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures By Fluorecent Hoechst 33258 Stain. *Exp. Cell Res.*, 104, 255-262.
- 2 — FOGH, J. and FOGH, H., (1965) : A Method for Direct Demonstration of PPLO in Cultured Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.* 117, 899-901.
- 3 — Food and Drug Administration, Bethesda MD 20205 Nov. 18, 1987, «Points to Consider in the Characterization of Cell-Lines Used to Produce Biologicals.»
- 4 — McGARRITY, G.J., PHILLIPS, D. and VAIDYA, A., (1980) : Detection of Mycoplasma hyorhinis infection in Cell Respiratory Cultures. *Cytogenet Cell Genet.*, 27, 194-196.
- 5 — McGARRITY, G.J., STEINER, T. and VANAMAN, V. (1983) : «Use of Indicator Cell Lines for Recovery and Identification of Cell Culture Mycoplasmas». *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 2, pp. 167-190, Acad. Press. Inc. N.Y., London.
- 6 — MOWLES, J.M. (1989) : The Use of Ciprofloxacin for the Elimination of Mycoplasma from Naturally Infected Cell-Lines. Accepted for Publication in *Cytotechnology*.
- 7 — POLAK, A.A., (1983) : Detection and Elimination of Mycoplasmas in Cell Cultures. Thesis, RIVM, Netherlands.
- 8 — PRECIOUS, B. and RUSSELL, W.C. (1987) : Growth, Purification and Titration of Adenoviruses. *Virology, a practical approach* ed. B.W.J. Mahy, IRL Press Ltd. Oxford, Washington D.C.
- 9 — ROBINSON, L.B., WICHELHAUSEN, R.B. and RAZINAN, B., (1956) : Contamination of Human Cell Cultures by Fleuro-pneumonia Like Organisms. 124, 1147-1150.
- 10 — RUSSEL, W.C., NEWMAN, C. and WILLIAMSON, D.H., (1975) : A Simple Cytochemical Technique for Demonstration of DNA in Cells Infected with Mycoplasmas and Viruses. *Nature (London)* 253, 461-462.
- 11 — STRANBRIDGE, E. and SCHNEIDER, E. L. : «The Need for Non Cultural Methods for the Detection of Mycoplasma Contaminants» Joint WHO/IABS Symposium on the Standardization of Cell Substrates for the Production of Virus Vaccines. Geneva, Dec. 1976. *Develop. Biol. Standard.* Vol. 37, pp. 191-200. (S. Karger, Basel, 1977).
- 12 — World Health Organization Technical Report Series 747, WHO Geneva, 1987. «Acceptability of Cell Substrates for Production of Biologicals.»



**TABLO 1 : İndikatör hücre kültürü kullanılarak gerçekleştirilen laboratuvar stok-  
larındaki hücre kültürlerinde mikoplazma kontrolleri sonucu.**

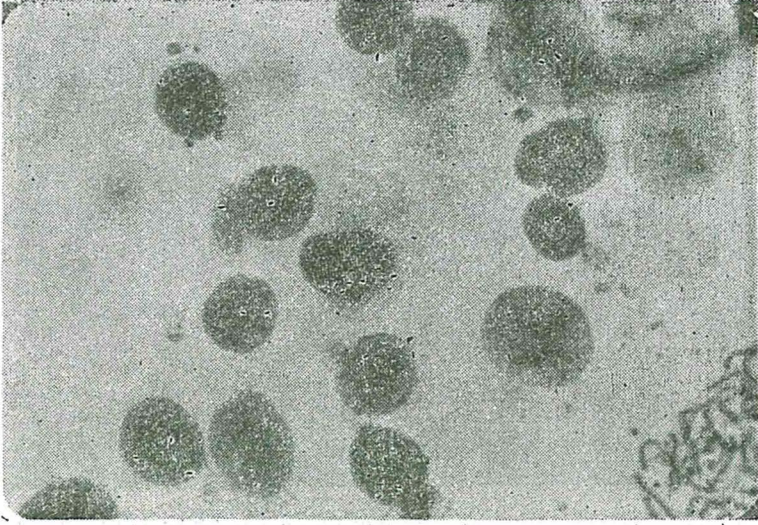
|              | Negatif<br>Kontrol | M.hyorninis | M.arginini | M.orate | BHK21<br>An <sub>13</sub> | BHK21<br>An <sub>14</sub> | BHK21<br>An <sub>30</sub> | BHK21<br>An <sub>31</sub> | BHK21<br>An <sub>31</sub> | IBRS <sub>2</sub><br>An <sub>2</sub> | Vero | FL | HPDLF | HGF |
|--------------|--------------------|-------------|------------|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------|----|-------|-----|
| Aceto-Orcein | —                  | +           | +          | +       | +                         | +                         | —                         | —                         | +                         | —                                    | —    | —  | —     | —   |
| DAPI         | —                  | +           | +          | +       | +                         | +                         | —                         | —                         | +                         | —                                    | —    | —  | —     | —   |

**TABLO II :** Laboratuvar şartlarında kontamine edilen hücre kültürlerinde mikoplazmaların iki boyama tekniği ile tespiti.

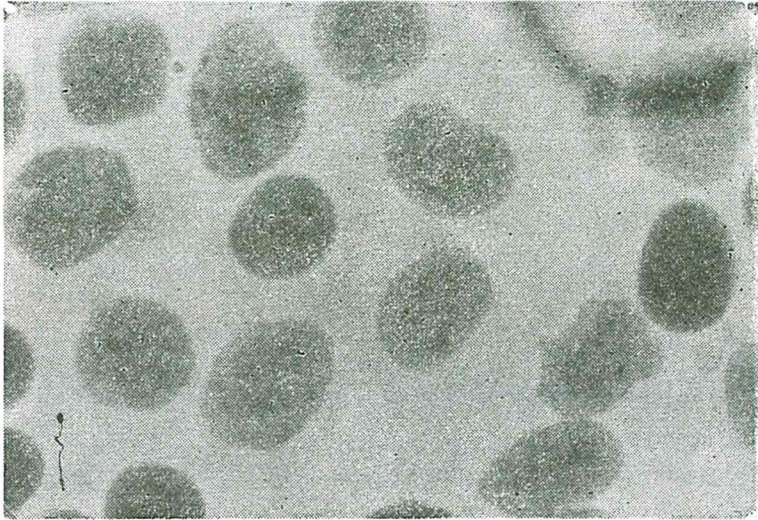
|               | Vero     |      | BHK21 An <sub>30</sub> |      | FL       |      |
|---------------|----------|------|------------------------|------|----------|------|
|               | A.orcein | DAPI | A.orcein               | DAPI | A.orcein | DAPI |
| M.hyorhinitis | +        | +    | -                      | +    | +        | +    |
| M.orginini    | -        | +    | +                      | +    | +        | +    |
| M.orable      | +        | +    | -                      | +    | +        | +    |
| Kontrol       | -        | -    | -                      | -    | -        | -    |

**TABLO III :** Farklı iki dilusyonda mikoplazma ile enfekte edilmiş hücre kültürlerinde iki ayrı teknik karşılaştırmalı olarak mikoplazma tespiti.

|                        |          | 1/10    |         |      | 1/100   |         |      |
|------------------------|----------|---------|---------|------|---------|---------|------|
|                        |          | Negatif | Pozitif | Oran | Negatif | Pozitif | Oran |
| Vero                   | A.orcein | -       | 5       | 5/5  | 4       | 1       | 1/5  |
|                        | DAPI     | -       | 5       | 5/5  | -       | 5       | 5/5  |
| FL                     | A.orcein | -       | 5       | 5/5  | 2       | 3       | 3/5  |
|                        | DAPI     | -       | 5       | 5/5  | -       | 5       | 5/5  |
| BHK21 An <sub>30</sub> | A.orcein | -       | 5       | 5/5  | 5       | -       | 0/5  |
|                        | DAPI     | -       | 5       | 5/5  | -       | 5       | 5/5  |

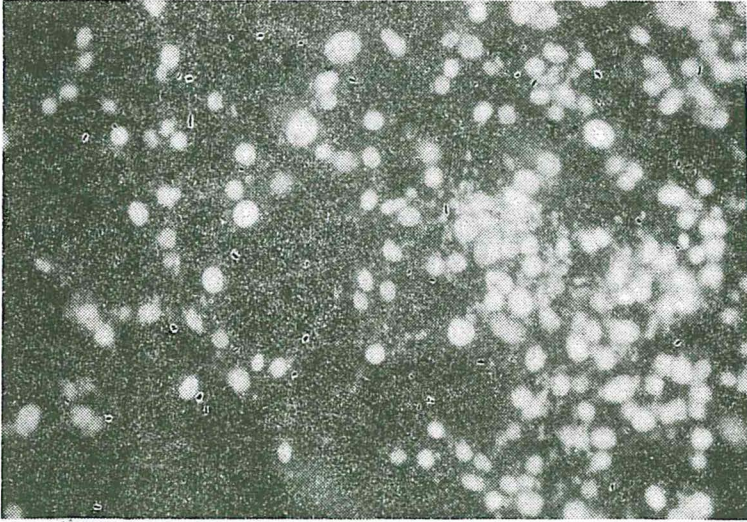


ŞEKİL I : Aceto-orcein ile boyanmış Mycoplasma ile kontamine hücre kültürü.

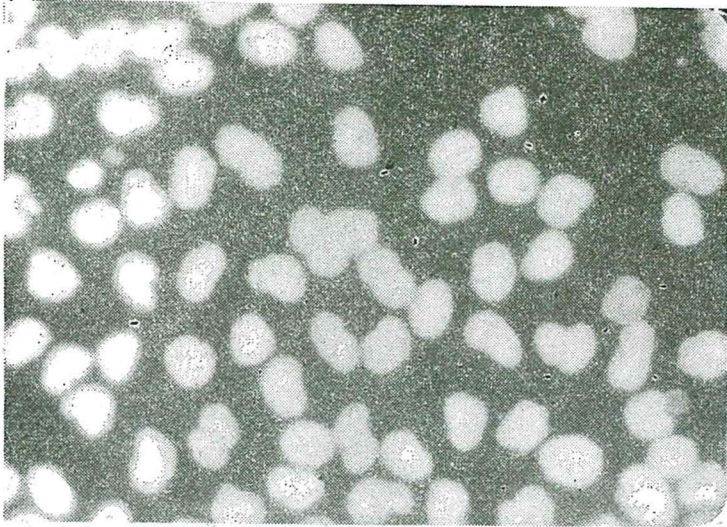


ŞEKİL II : Aceto-orcein ile boyanmış Mycoplasmadan arı hücre kültürü.





ŞEKİL III : DAPI ile boyanmış Mycoplasma ile kontamine hücre kültürü.



ŞEKİL IV : DAPI ile boyanmış Mycoplasma'dan arı hücre kültürü.