

کنترل کیفی در بانک‌های سلولی

زیبا قاسمی M.Sc.^۱، نریمان مصفا D.V.M., Ph.D.^{۲*}

۱. سازمان تامین اجتماعی، بیمارستان شهید دکتر فیاض بخش، واحد آزمایشگاه

۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵۴۷۱۹، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی

پست الکترونیک: Email: mosaffansar@yahoo.com

مکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۱۰/۷

بانک سلولی عبارت است از مخزن نگهداری طولانی مدت ذخایر سلولی که نیازمند مراقبت ویژه و کیفیت بالای حمایتی به منظور اطمینان از سلامت موجودی حاضر در آن باشد.

اصلی‌ترین هدف برقراری و ثبات در بانک‌های بیولوژیک، تامین منابع سلولی در اهداف مرتبط با کشت سلولی در یک مسیر جهانی و خدماتی است. چرا که تکنولوژی کشت سلول یک ابزار معتبر و قابل اعتماد برای محققان است و در پیشبرد اهداف علمی کاربرد زیادی دارد.

ثبات موفقیت آمیز و رو به رشد سلول‌ها نیازمند اطلاعات فراوان از اجرای روش‌های اساسی است. در بسیاری از فضاها پژوهشی علوم پزشکی و برنامه‌های دارویی، تیره یاخته‌های مداوم و سلول‌های موجود در بانک‌ها، جایگاه ویژه‌ای دارند. بر طبق راهبردهای ذکر شده فوق، تشکیلاتی که در آغاز مسیر جمع‌آوری و نگهداری سلول‌ها و جنبه‌های امنیتی و حفاظتی آنها پیش‌رو مطرح می‌گردد نیازمند کنترل کیفی است که اهمیت ویژه‌ای در ثبات بیولوژیک سلول‌های ذخیره شده دارد. در این مقاله مکانیسم‌هایی مطرح می‌شوند که به وسیله آنها، ساختارهای جمعیتی سلولی مشخص می‌شود. همچنین روش‌هایی معرفی می‌شوند که پرسه‌های کامل منتهی به تکمیل مشخصات سلولی را در بررسی‌های مربوط به توان تکثیری و حیاتی سلول‌ها توضیح می‌دهند. خصوصیت رشد ثابت و یکنواخت سلول‌ها که اجازه عضویت آنها را در بانک‌های سلولی می‌دهد نیز با تکیه بر منشأ سلول و روش نگهداری آن و روش‌های کنترل کیفی مداوم معرفی شده است. در این مقاله سعی شده است توصیه‌هایی در زمینه استفاده از روش‌های حذف‌کننده مایکو پلاسما و سایر عوامل میکروبی که به شدت سیستم‌های بانک سلولی را در معرض خطر قرار می‌دهند ارائه گردد.

کلیدواژگان: بانک سلولی، مایکوپلاسما، کنترل کیفی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۳۱۴-۳۰۴

مقدمه

امروزه با پیشرفت علم و گرایش روند مطالعات و تحقیقات به زمینه‌های بیولوژی مولکولی و ژنتیک سلولی و گسترش روش‌های فوق العاده حساس نظیر آنالیزهای سلولی، پلی مورفیسم ژنتیکی، PCR و (Microarray) تجارب، تعداد و تنوع نمونه‌های جمع‌آوری شده و ذخیره شده برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و کلینیکی افزایش چشم‌گیری یافته است و به روش‌های جدید جمع‌آوری و پردازش نمونه‌ها و بانک‌های سلولی پیشرفته احتیاج است تا بتوان حداکثر اطلاعات را از هر نمونه به دست آورد. به طوری که منابع در دسترس و جامعی جهت مطالعات آینده در اختیار باشند. در این راستا با ارایه هر تکنولوژی جدید به روند کنترل کیفی جدیدی نیاز است تا بدین وسیله نسل‌های آینده قادر به استفاده از این تجربیات باشند. این کنترل باید از زمان شروع جمع‌آوری، پردازش و آماده کردن نمونه‌ها و نیز در کلیه مراحل ذخیره‌سازی نمونه‌ها در بانک‌های سلولی به طور کامل و دقیق اعمال شود. در کشور ما نیز با توجه به رشد روزافزون بانک‌های سلولی و ملی و تاسیس مراکز جدید نگهداری سلول، لازم است با مطالعه وضعیت کنترل کیفی این مجموعه‌ها و توجه به نکات کلیدی، آن

هم با استفاده از الگوهای مشابه در خارج از کشور روند رو به رشد تکنیک‌های تولید سلولی را شتاب بخشید.

جمع‌آوری نمونه و پردازش آن

برای هر تیره (Line) سلولی و محصولات آن به موارد زیر باید توجه کرد:

۱. تاریخچه و خصوصیات عمومی تیره سلولی

۲. سیستم بانک سلولی

۳. آزمایش‌های کنترل کیفی

۱. تاریخچه و خصوصیات عمومی تیره‌های سلولی

در این بحث کلیه خصوصیات مربوط به نمونه مورد مطالعه مشخص می‌شود. در بدو مطالعه، جهت نمونه‌گیری بایستی رضایت بیماران یا نمونه دهندگان فراهم و اطمینان خاطر آنان از بابت محرمانه بودن روند کار چه در مطالعات کنونی و چه در مطالعات آینده، به طور کامل فراهم شود. محققان باید دستورالعمل مکتوبی از شروع جمع‌آوری

استفاده شوند (۱).

زمان بین جمع آوری و پردازش نمونه‌ها نیز مهم است. در برخی موارد حتی می‌توان کشت سلول را ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از جمع آوری نمونه انجام داد اما در شرایط دیگری مثل جستجوی سایتوکاین‌ها، عملیات باید بلافاصله بعد از جمع آوری نمونه آغاز شود (۲).

نمونه‌های ناپایدار باید در همان مکان جمع آوری و پردازش شوند و سپس به آزمایشگاه مورد نظر انتقال یابند. کنترل حرارت نیز در تمامی مراحل جمع آوری، انتقال، پردازش و ذخیره نمونه مورد توجه قرار می‌گیرد. مثلاً ترکیبات متفاوت خون در دمای مختلف ذخیره می‌شوند (۳). شکل یک چگونگی پردازش نمونه خون را در یک بانک سلولی نشان می‌دهد.

با توجه به اینکه تکرار عمل ذوب و انجماد نمونه، موجبات کاهش اثر نمونه را فراهم می‌سازد بهتر است نمونه‌ها را از ابتدا بر حسب مقدار مورد نیاز در هر بار استفاده، درلوله‌های کوچک جداگانه (Aliquot) ذخیره کرد. سترون کردن و ممانعت از آلودگی‌های میکروبی نیز بسیار حایز اهمیت است که در بخش آزمایش‌های کنترل کیفی به تفصیل مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت (۱).

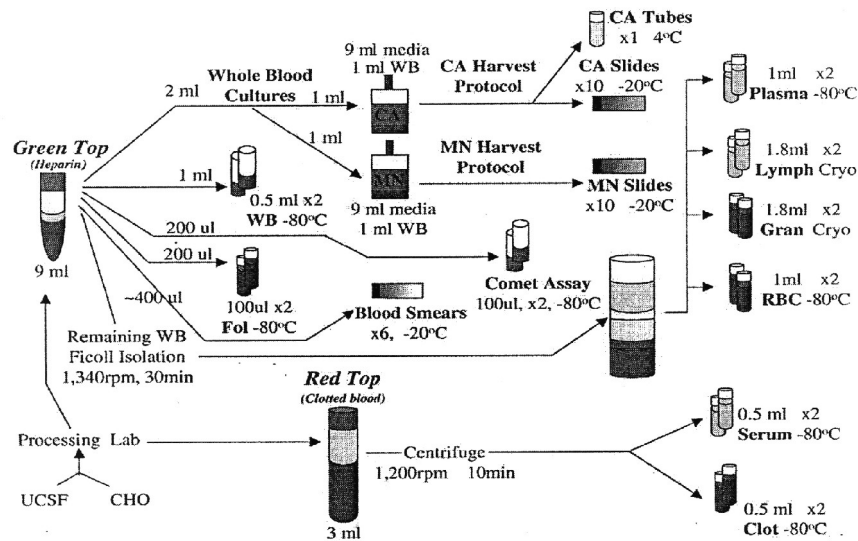
همچنین تاکید می‌شود که برچسب نمونه حتما شامل این اطلاعات باشد: نام، سن، جنس، تاریخ تولد، عکس، آدرس، تاریخچه تیره سلولی، آلودگی ویروسی ممکن، آلودگی با ویروس‌ها، خصوصیات فیزیکی شیمیایی، نحوه پردازش، حرارت، پایداری، تاریخ تهیه، روش تنظیم، حجم نمونه، نحوه حمل نمونه، درجه خلوص محصولات نهایی، خصوصیات مولکولی و بیولوژیکی و سایر خصوصیات که معرف هر نوع ویژگی نمونه مورد نظر باشد. برای دسترسی آسان به این حجم وسیع اطلاعات و نمونه‌ها، نمونه باید در کوچک‌ترین شکل ممکن ذخیره شود تا امکان ذخیره‌سازی بیشترین نمونه در کمترین فضا امکان‌پذیر باشد.

نمونه، نحوه انتقال آن، پردازش و چگونگی ذخیره آن در دست داشته باشند (۱).

جمع آوری نمونه

توجه به زمان و مکان و سرعت جمع آوری نمونه، حجم مورد نیاز، نوع مخازن قابل حمل مناسب جهت حمل نمونه‌ها ضروری است. در مواردی که نیاز به انتقال نمونه‌ها از محل جمع آوری به آزمایشگاه تحقیقاتی است باید حتماً به نحوه جابجایی صحیح نمونه‌ها توجه شود و یک سیستم پست الکترونیکی یا تلفن در دسترس باشد تا در صورت بروز هر گونه مشکل بتوان با مراکز مربوطه تماس برقرار کرد. در زمان نمونه‌گیری، نمونه‌هایی که جهت اخذ آنها از روش‌های غیرتهاجمی استفاده می‌شوند (نمونه‌های ادرار یا سواپ دهان) را می‌توان در هر مکان جمع آوری و طی شرایط استاندارد مشخص شده در دستورالعمل نحوه جمع آوری و نگهداری نمونه به آزمایشگاه ارسال کرد. ولی در مورد نمونه‌های به دست آمده با روش‌های تهاجمی همچون استفاده از سرنگ و خون‌گیری یا تکه‌برداری علاوه بر نیاز به تعداد زیادتر پرسنل، محدودیت مکانی نیز اعمال می‌شود. در مورد پرسنل رعایت کلیه نکات مربوط به انتقال صحیح نمونه‌ها، چه از نظر محافظت از نمونه در حین انتقال و چه از نظر محافظت از خود پرسنل به جهت عفونی‌الزامی است و در کشورهایی که نسبت بیماری‌های عفونی در آنها بالاست و امکاتماس با نمونه‌ها وجود دارد، این مراقبت‌ها در موارد کاربرد سوزن یا دیگر وسایل تیز جهت نمونه‌گیری بیشتر لازم است. البته همه نمونه‌ها حتی نمونه‌های مربوط به اهدا کنندگان سالم و کودکان نیز باید از نظر عوامل عفونی همچون هپاتیت و ایدز بررسی شوند (۱).

در مورد نمونه‌های ناپایدار، فاکتورهای همچون زمان، حرارت، استفاده از پایدارکننده‌های شیمیایی و بافرها مورد توجه قرار می‌گیرند. در مورد استفاده از ضد انعقادها و عوامل پایدار کننده، بهتر است ابتدا در یک نمونه کوچک امتحان شود و سپس برای مطالعات بزرگ‌تر

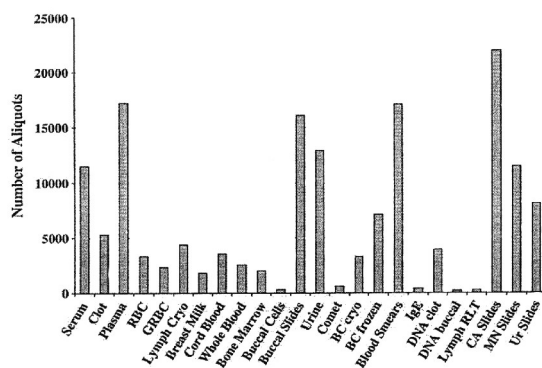


شکل ۱: مراحل پردازش و حرارت‌های لازم جهت ذخیره ترکیبات مختلف خون

MCB در واقع محل ذخیره تیره‌های سلولی جدید است که ابتدا سلول ذخیره شده مورد ارزیابی کنترل کیفی قرار می‌گیرد. اگر تمامی آزمایش‌های کنترل کیفی نتایج قابل قبولی داشتند روند کار ادامه می‌یابد. این تیره‌های سلولی به صورت تقسیمات مجزا در سرما نگهداری می‌شوند. سرمای مورد نیاز توسط مخازن مایع یا گاز حاوی نیتروژن مایع تامین می‌شود. در مواردی مثل مطالعات کروموزومی که به کشت سلولی احتیاج است مواد محافظت کننده سلول از یخ‌زدگی مانند (دی متیل سولفاکساناید) DMSO برای حفاظت سلول‌ها از تخریب هنگام انجماد و نگهداری در نیتروژن مایع آن هم در برودت کمتر مورد نیاز است. در مجموع MCB محل ذخیره تیره‌های سلولی جهت استفاده بعدی در MWCB محسوب می‌شود (۵).

بانک MWCB

این بانک سلولی محل انجام کارهای تحقیقاتی است که یک یا چند نمونه از سلول‌های موجود در MCB در این مراکز کشت داده می‌شوند و با انجام (sub cultures) روش‌های پاساژ سلولی به دفعات، تعدادی از سلول‌های MCB جهت تولید و تهیه تیره‌های سلولی مورد نیاز انتخاب می‌شوند. این تیره‌های سلولی در لوله‌های (vials) منفرد توزیع و در سرما نگهداری می‌شود تا جهت تولید محصولات بیولوژیکی به مصرف MWCB برسد. در صورت مصرف دو نمونه MCB باید محتوای سلولی هنگام ذوب شدن با هم مخلوط شود. در هر دو سیستم MCB و MWCB در مورد تیره‌های سلولی diploide باید تعداد بسیار کمی از سلول‌های تقسیم شونده ذخیره شوند. همچنین نمونه‌ها باید دارای برجسب مشخصات باشد و به صورت دوتایی و در دو منطقه جداگانه ذخیره شود تا از کاهش ذخایر تیره‌های سلولی جلوگیری و از همه نمونه‌های موجود در بانک‌ها فهرست جامعی تهیه شود (۵). نمودار یک انواع نمونه‌های جمع‌آوری شده و ذخیره شده در یک بانک سلولی را معرفی و تفکیک می‌کند:



نمودار ۱: منابع مختلف تهیه و اخذ نمونه‌های سلولی به تفکیک و بر اساس تقسیمات حجمی و عددی معرفی شده‌اند.

آزمایش‌های کنترل کیفی

در این قسمت به مجموعه روش‌هایی که جهت ارزیابی تیره‌های

بر همین اساس کلیه نمونه‌ها دارای کد شناسایی خاصی می‌شوند که همه اطلاعات فوق را در خود ذخیره دارد. همچنین جهت به حداقل رساندن اطلاعات کدها روش‌هایی به کار گرفته می‌شود از جمله استفاده از ریزپردازنده‌های رمزدار (Barcode). این بارکدها شامل مقادیر زیادی از اطلاعات در یک ناحیه خیلی کوچک‌اند و به صورت برجسب روی مخازن حاوی نمونه قرار دارند که این روش برای استفاده عمومی در ۵ تا ۸ سال آینده به کار می‌آید. نکته قابل توجه این است که دسترسی به این اطلاعات عمومی نیست و این اطلاعات به صورت محرمانه فقط در دسترس رییس آزمایشگاه و افراد خاص است (۳).

در پایان یادآوری می‌شود بهتر است نمونه‌ها به صورت دوتایی و در صورت امکان در بانک‌های مختلف ذخیره شوند تا در صورت ایجاد نقص در یکی، استفاده از دیگری امکان‌پذیر باشد. نمونه‌ها پس از پردازش در بانک‌های سلولی جهت استفاده‌های کلینیکی یا استفاده در تحقیقات آینده نگهداری می‌شوند (۱).

۲. سیستم بانک سلولی

هنگامی که یک تیره سلولی به عنوان منشای بیولوژیکی یک محصول انتخاب شود، بانک سلولی جهت ذخیره این محصولات برای استفاده در فواصل زمانی متفاوت مطرح می‌شود بانک‌های تولید شده برای مصارف انسانی و درمان‌های جراحی نظیر بانک‌های فیبروبلاستی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در واقع هدف اصلی یک بانک بیولوژیکال، ذخیره نمونه‌های جمع شده حاصل از مطالعات علمی است که حد اکثر اطلاعات هر نمونه را جهت آزمایش‌های آینده فراهم می‌سازد. شکل دو بیان‌گر مراحل یک مطالعه بیولوژیک است (۴).

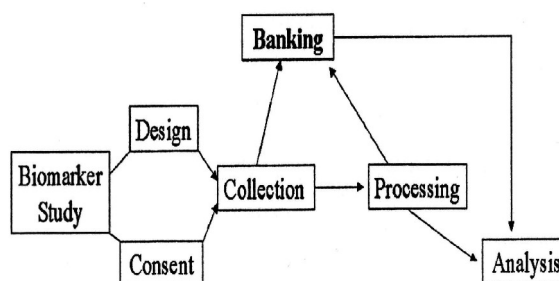
بانک‌های سلولی به دو صورتند:

۱. Master Cell Bank : MCB

۲. Manufacturer's working cell Bank : MWCB

بانک MCB

شامل مجموعه‌ای از سلول‌های همسان است که هر دسته از یک بافت مشخص مشتق شده‌اند.



شکل ۲: مراحل مختلف در ایجاد بانک‌های سلولی

سلولی موجود در بانک‌های سلولی طراحی شده است می‌پردازیم.

برخی از آزمایش‌های قدیمی امروزه محدود یا اصلاح شده‌اند که در ابتدا نگاهی اجمالی به آنها داریم:

الف) کاربولوژی: جهت بررسی تیره‌های حاوی سلول‌های دیپلوئید که امروزه دیگر انجام نمی‌شود (۶).

ب) تومورژنیسی: کلیه سلول‌های پایدار و تیره‌هایی با منشا جوندگان سرطان‌زا است لذا نیازی به انجام این آزمایش برای بررسی قدرت سرطان‌زایی ندارند. اما تیره‌های سلول‌های اپی‌تلیال انسانی و همه سلول‌های مورد استفاده جهت تولید واکسن و ویروس زنده در این آزمایش بررسی می‌شوند.

علاوه بر این، در برخی موارد سلول‌های مورد استفاده در مطالعات سلولی یا ژن درمانی ممکن است به این آزمایش نیاز داشته باشد. اندازه‌گیری پروتئینهای داخل سلولی و فرآورده‌های سرطان‌زا مانند Bid، Bax، Ras و غیره می‌تواند در یک روند سیتوشیمیایی به مطالعات سرطان شناسی سلول‌ها کمک شایانی نمایند (۷).

ج) آزمایش آنکوژن: که امروزه دیگر مورد استفاده قرار نمی‌گیرد (۶).

سنجش کمی سلول‌های دارای حیات (Haemocytometer)

در این روش از شمارش مستقیم تعداد سلول‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ معمولی، همراه با استفاده از یک رنگ حیاتی (تریپان بلو Trypan blue) جهت تمایز بین سلول‌های دارای حیات و سلول‌های فاقد حیات استفاده می‌شود.

این آزمایش قادر به تمایز بین سلول‌های دارای اندازه مختلف و توده‌های سلولی نیست. این روش ساده، سریع و ارزان است و فقط به مقدار بسیار کمی از سلول‌های معلق احتیاج دارد.

استفاده از دستگاه الکترونیکی شمارش سلولی رایج‌ترین روش دقیق و موثر شمارش سلول‌ها است: که شامل یک ستون شمارنده با قطر ۰/۱ میلی‌متر و یک میدان جداسازی تسهیل‌کننده شمارش است.

با استفاده از یک رنگ حیاتی همانند تریپان بلو می‌توان شمارشی از سلول‌های زنده و غیرزنده به دست آورد. به طوری که با استفاده از این رنگ سلول‌های زنده بی‌رنگ باقی می‌مانند و سلول‌های مرده رنگ آبی به خود می‌گیرند. از آنجایی که این رنگ دارای خاصیت سمی برای سلول‌ها است تاخیر در شمارش باعث ایجاد اختلال در وضعیت حیاتی سلول‌ها می‌شود. رنگ‌پذیری سلول‌ها ناشی از اختلالات غشایی، نفوذپذیری رنگ به درون سلول و عدم قابلیت حیات این سلول‌ها است (۸).

در حین شمارش سلول‌ها توسط دستگاه فوق دقت در نمونه‌برداری، رقت صحیح و برگردن دقیق ستون شمارش ضروری است. برگردن بیش از اندازه ستون، وجود حباب‌های هوا و عدم نظافت کامل ستون باعث ایجاد خطا در روند آزمایش می‌شود. انجام شمارش سلولی به صورت دوتایی از ایجاد خطاهای آماری ناخواسته جلوگیری می‌کند (۸).

نکته مهم این است که شمارنده‌های الکترونیکی فقط در موارد

سوسپانسیون‌های فاقد توده مفیدند. در غیر این صورت اگر توده‌های سلولی بزرگ وجود دارد و در مواردی که سلول‌ها غیرقابل دسترس هستند و یا امکان استفاده از تریپسین برای معلق کردن سلول‌ها وجود ندارد شمارش هسته‌های سلول‌ها پس از حل کردن سیتوپلاسم توصیه می‌شود (۸).

روش نشان‌گر تقسیم سلولی یا (Mitotic Index) برای شمارش سلول‌های زنده دارای قدرت تقسیم نیز مطرح است. در برخی موارد سنجش توده سلولی بر سنجش تعداد سلول‌ها ارجح است. در چنین مواردی اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی (احتیاج به مقادیر زیاد نمونه)، اندازه‌گیری پروتئین (بهترین پارامتر)، تعیین میزان DNA، نیتروژن و یا لیپیدها توصیه می‌شود. گاهی در کشت‌های تک لایه‌ای یا سلول‌های ثابت، شمارش مستقیم سلول‌ها امکان ندارد و لازم است از یک روش سنجش غیرمستقیم استفاده شود. تعدادی از این روش‌ها عبارتند از: محاسبه نسبت از دست دادن و مصرف گلوکز یا اکسیژن توسط تعداد مشخص سلول‌ها با استفاده از منحنی‌های استاندارد و نیز تغییرات سوخت و ساز موادی چون لاکتیک اسید، پیرویک اسید و دی‌اکسید کربن که البته در مراحل مختلف چرخه رشد یک سلول خاص تغییر می‌یابند و یا ممکن است تغییرات محیط کشت بر این نسبت‌ها تاثیر بگذارد. با تمامی احوال این پارامترها نشانه خوبی از حجم سلول‌های زنده در یک کشت سلولی محسوب می‌شوند. لازم به ذکر است تغییرات حاصله از قندی شدن (glycation) و ترکیب با قند (glycozylation) سلول‌های تحت کشت که ناشی از تغییرات قند در محیط‌اند اثر بالقوه‌ای بر فعالیت‌های اکسیداتیو سلول‌ها در آینده دارد (۹).

همچنین برخی از تیره‌های سلولی مانند سلول‌های بنیادی مزانشیم انسانی برای رشد و بقا نیاز به مقدار کمی گلوکز دارند. که این سلول‌ها با منشا و روشی متفاوت با پدیده فوق هستند و نیاز آنها به گلوکز محیط کشت در غلظت بالایی قرار دارد.

گاهی اوقات هدف از برآورد و تعیین میزان حیات سلول‌ها، سنجش میزان فعالیت‌های هسته‌ای سلولی و وقوع تقسیم میتوز سلولی است. به عنوان مثال در موارد خاصی از رادیو ایزوتوپ‌ها جهت بررسی نسبت ساخت پروتئین، DNA و RNA استفاده می‌شود. با استفاده از رادیو ایزوتوپ‌ها می‌توان چنین مواردی را با دقت ارزیابی کرد. مثلا در برخی مطالعات، کرومیوم رادیواکتیو به پروتئین‌های موجود متصل می‌شود و در سلول آسیب دیده یا مرده این پروتئین نشان‌دار در مایع روی محیط کشت سلول‌ها آزاد باقی می‌ماند (Chromium Release Assay) اندازه‌گیری رادیوایزوتوپ موجود در محیط، بیان‌گر میزان حیات سلول‌ها است (۱۰).

اثر تشکیل توده‌های سلولی (Colony - Forming Efficiency)

در برخی از بانک‌های سلولی نظیر مواردی که هدف، تولید یاخته‌های بنیانی است از نظر تشکیل توده‌های سلولی، مورد توجه‌اند. از آنجایی که حرکت رو به مرکز این سلول‌ها با ایجاد شبکه‌های به هم

است و همچنین آزادی LDH به شدت آسیب‌غشایی و یا انهدام کامل سلول بستگی دارد. وضعیت کشت نیز در سطح LDH داخل سلولی اثر دارد. در مواردی که سلول‌های بانک به منظور اهداف سمیت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در مطالعات سرطان‌شناسی و بررسی اثر داروهای شیمی‌درمانی طی یک دوره طولانی کشت از حیث وضعیت نیز می‌توان از روش LDHactivity بهره جست (۱۴).

قرمز خنثی (Neutral Red)

این ماده یکی از رنگ‌های مهم در تعیین سلول‌های زنده و فعال است که در لیزوزوم‌های سلول‌های زنده جمع می‌شوند و توسط آنکسار نورشناسی (spectrophotometry) سنجیده می‌شود. این روش ساده، سریع، حساس و مقرون به صرفه است و مهمترین مزیت آن اجتناب از ورود سرم به محیط است. لازم به ذکر است هیچ یک از روش‌های فوق جهت بررسی قدرت حیات سلول‌ها بر دیگری برتری ندارد و بهتر است دو یا چند روش همزمان استفاده شود تا دقت لازم را ایجاد گردد. این آزمایش‌ها قادر به آشکارسازی فشارهای موجود بر سلول‌ها (رقیق شدن، مخلوط شدن، کهنه شدن و یا قرار گرفتن تحت اثر تریپسین شدن و غیره) هستند (۱۵).

قدم بعدی در روند کنترل کیفی بانک‌های سلولی، بررسی و تشخیص عوامل غیرطبیعی در تیره سلولی موجود است. آزمایش‌های تشخیصی برای بررسی عوامل غیرطبیعی شامل آزمایش‌های تشخیصی آلودگی با مایکو پلاسما، باکتری، قارچ و ویروس است (۵).

مایکوپلاسما

مایکوپلاسما یک اصطلاح کلی برای ارگانیسم‌های راسته مایکوپلاسما تالها است که قادر به آلوده کردن کشت‌های سلولی هستند و به خانواده مایکوپلاسماتاسیه (مایکوپلاسما) و اکوپلاسماتاسیه (اکوپلاسماتاسیا) تعلق دارند.

وجود مایکوپلاسما در محیط‌های کشت باعث اثراتی چون بروز کروموزوم‌های غیرطبیعی، تبدیل و تحول (Transformation)، تغییرات نسبت رشد و رقابت مایکوپلاسما با سلول‌ها جهت مصرف غذا می‌شود. برخی گونه‌های مایکوپلاسما پاتوژن‌اند و یا ممکن است مواد فعال بیولوژیکی تولید کنند. بنابراین حضور آن‌ها در تیره‌های سلولی مورد استفاده جهت تهیه محصولات درمانی پزشکی قابل قبول نیست. محصولات چگون واکسن‌های ویروسی، آنتی‌بادی‌های تک‌ستونی (monoclonal Abs)، تنظیم‌کننده‌های ایمونولوژیکی، اینترفرون‌ها و سایر سایتوکاین‌ها، اریتروپوئیتین، فاکتورهای رشد و سایر محصولات حتماً باید از لحاظ فقدان آلودگی با مایکوپلاسما قبل از استفاده بررسی شوند.

آلودگی کشت‌های سلولی با مایکوپلاسما اولین بار در سال ۱۹۵۶ توسط رابینسون گزارش شد. ورود چنین عفونتی از آن زمان تا به امروز در آزمایشگاه‌های متفاوت متغیر است. در حال حاضر حدود ۱۲ درصد تیره‌های سلولی آلوده هستند.

پیچیده یا استقرار پایدار آنها در محیط هماهنگی دارد، لذا توجه به ریخت‌شناسی دستجات سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و به خصوص از حیث وجود عوامل سمی در محیط کشت که مانع بروز این پدیده می‌شود، اطلاعات لازم را در اختیار می‌گذارد. همانطور که می‌دانیم پرورش و نگهداری سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز در آزمایشگاه و بانک‌های سلولی و بررسی ریخت‌شناسی آنها از طریق آزمایش سنجش ایجاد توده سلولی مقدور است. از این سلول‌ها در تمایز به رده‌های مختلف با عنوان سلول‌های مولد توده نام برده می‌شود. آنها در محیط‌های نیمه جامد قادر به تشکیل توده سلولی هستند و بنابراین یکی از راه‌هایی که می‌تواند از حیث کنترل کیفی سلول‌های بنیادی و کسب اطمینان از خلوص و یکنواختی آنها در آزمایشگاه بانک سلول مورد استفاده قرار گیرد، آزمون بررسی توان‌مندی آنها در ایجاد توده Colony Forming Efficiency است (۱۱).

بانک MTT

در این روش با استفاده از رنگ ۳-(۴،۵) دی میتیل تiazول، ۲ دی فنیل برومید تترازولیوم) فعالیت آنزیم‌های داخل میتوکندری با رنگ سنجی اندازه‌گیری می‌شود. این روش بر مبنای احیای نمک تترازولیوم است که سلول‌های زنده در معرض نمک قرار می‌گیرد و آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سیتوکروم C، b در سلول زنده شکل زرد نمک تترازولیوم محلول را در اثر احیا به یک فورمازان ارغوانی داخل سلولی غیرمحلول تبدیل می‌کند. با طیف‌سنجی، مقدار فورمازان ایجاد شده که معرف تعداد سلول‌های زنده در کل سلول‌ها است مشخص می‌شود (۱۲).

جهت ارزیابی و تعیین قدرت حیات (vitality) سلول‌های محیط کشت چه به صورت چسبنده و چه در مورد تیره‌های یاخته‌های شناور همچون سلول‌های سرطانی مشتق از خون و مغز استخوان (مانند K562) می‌توان از این روش با ارزش مولکولی بهره جست. در مورد آزمایش‌های برآورد سمیت سلولی و اعمال مراقبتی لئفوسیت‌های کشته سلول‌های سرطانی و برآورد فعالیت ضد تکثیر آنها نیز روش M.T.T یک روش ارزشمند و مقرون به صرفه محسوب می‌شود (۱۳).

دقت شود که هرگونه آلودگی سیستم‌های بانک سلولی با عوامل میکروبیولوژیک به خصوص پروبیوتیک‌ها که قدرت تقسیم‌شدگی سلول‌ها را تغییر می‌دهند، می‌تواند بر نتایج آزمون M.T.T اثر بگذارد (۱۳).

فعالیت لاکتات دهیدروژناز LDH

اساس این روش بر رهایی LDH توسط سلول‌های مرده و آسیب دیده در محیط کشت استوار است که در یک روش رنگ‌سنجی میزان LDH آزاد شده اندازه‌گیری می‌شود و در واقع این آزمایش نشان‌دهنده سلول‌های غیرزنده است. البته طی یک روند رقت‌شناسی (Titration) معکوس می‌توان همه سلول‌ها را به طور مصنوعی منهدم و LDH توتال سلول‌ها را اندازه‌گیری کرد. با توجه به نوع سلول، پایداری LDH متغیر

تفاوت مایکوپلازماها نسبت به سایر پروکاریوتها نبود دیواره سلولی و اندازه کوچک آنهاست. مایکوپلازما کوچکترین پروکاریوتی است که مستقلا تکثیر می کند و قطری معادل ژنوم اشرشیاکلی دارد (۱۶).

آلودگی محیط کشت تنها با مایکوپلازما می تواند این اثرات را در پی داشته باشد:

القای تغییرات کروموزومی

القای تغییرات ریخت شناسی سلولهای آسیب دیده

دخالت در سرعت رشد سلولها

اثر بر متابولیسم اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه

القای تغییرات غشای سلولها و حتی تغییر و تحول سلولی (۷)

پنج گونه مایکوپلازما مهم ترین عوامل آلودگی محیطهای کشت به شمار می روند که عبارتند از:

M. hyorhinis در خوک، *M. arginini* و *M. laid lawii* در

گاو و *M. orale* و *M. fermentans* در انسان (۱۷).

اما آنچه که از دید کنترل کیفی مهم است تکنیکهای موجود جهت آشکار ساختن وجود آلودگی با مایکوپلازما در تیره های سلولی از جمله رنگ آمیزی، کشت، نشانگرهای DNA و کشت هم زمان است. لازم به ذکر است که جهت به حداقل رساندن اثر عوامل ایجادکننده مثبت کاذب و منفی کاذب بهتر است حداقل دو روش هم زمان به کار گرفته شود. چون مقاومت گونه های مایکوپلازما به صورت ماکروسکوپی و یا با میکروسکوپهای نوری استاندارد قابل تشخیص نیست و با کتری به راحتی می تواند در (Aerocells) قطرات و مواد حاصله از کشت های سلولی آلوده مخفی شود لذا به راحتی می تواند در کشت ها و حتی بین آزمایشگاه های مختلف گسترش یابد و لازم است که روش های مورد استفاده دارای حساسیت کافی باشند. در ذیل به شرح برخی از این روش ها می پردازیم (۱۷).

رنگ آمیزی DNA

این رنگ آمیزی دارای حساسیت بالایی است. سمیت رنگ Hoechst 33258 ناشناخته است و لذا هنگام کار با پودر یا محلول رنگ به صورت دستی حتما بایستی از دستکش استفاده شود. در تمامی مراحل از آب دوبار تقطیر شده استفاده و محلول رنگ در هر بار آزمایش به صورت تازه به تازه تهیه شود.

قبل از هر توضیحی لازم به ذکر است که در هر دو روشی که هم زمان برای آشکار شدن آلودگی مایکوپلازما استفاده می شود قاعده کلی بر این اساس استوار است که سلولهای مورد بررسی از نظر مایکوپلازما قبل از هر گونه امتحانی حداقل دو مرتبه در محیط فاقد هرگونه آنتی بیوتیکی تجدید کشت داده می شوند. چرا که حضور آنتی بیوتیک ممکن است عفونت را مخفی کند. همچنین سلولهایی که در لوله های منجمد شده نگهداری می شوند نیز نیاز به دو مرتبه تجدید کشت (passage) دارند چرا که نگهدارنده های سرمازا نیز گاه عفونت را مخفی می سازند (۱۸).

جهت رنگ آمیزی DNA از دو محیط Mycoplasma broth base و Mycoplasma agar base استفاده می شود که این محیطها نیز باید در صورت نیاز تازه تهیه شود.

در ابتدا تعداد مورد نیاز از سلولهای تیره مورد آزمایش ($5 \times 10^5 \text{ cell ml}^{-1}$) را توسط یکی از روش های از قبل توضیح داده شده شمارش می کنیم و تعداد مشخصی از سلولها را به محیط نیمه چسبنده حاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) اضافه می کنیم. به طوری که سلولها در سطح چسبنده انتشار یابند. در انتها، روز اول و سوم پس از رشد در گرم خانه (Incubation) سلولها را از نظر وضعیت حیات مشاهده می شوند.

در صورتی که احتمال از دست رفتن خاصیت سلولها پس از سه روز رشد در این محیط باشد باید محیطی مخلوط از محیط اولیه و اصلی سلولها و محیط فعلی تهیه شود و سلولها در آن معلق شوند.

سپس ۲ تا ۳ میلی لیتر از سلولهای مورد نظر را به هر یک از دو محیط کشت بافت (آگار و آب گوشت) اضافه می کنیم و در شرایط 36 ± 1 درجه سانتی گراد و به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت رشد می دهیم. پس از ۴۸ ساعت یکی از طرفها را جهت اطمینان از عدم آلودگی با کتریایی و قارچی برداشته و با میکروسکوپ معکوس (invert) با درشت نمایی $100 \times$ مشاهده می کنیم. سپس سلولها را با تقریباً ۲ میلی لیتر ماده ثابت کننده Carnoy's که به صورت قطره قطره به جدار ظرف اضافه می شود ثابت می کنیم و به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار می دهیم. اضافه کردن قطره قطره خصوصاً برای سلولهای معلق مهم برای جلوگیری از رانده شدن سلولها به یک طرف ظرف است.

سپس ماده ثابت کننده را خالی می کنیم و اجازه می دهیم تا در سطح چسبنده محیط به مدت ۳۰ دقیقه در هوا خشک شود.

در مرحله بعد ۲ میلی لیتر از رنگ هوخست (Hoechst) را به مدت ۵ دقیقه روی محیط کشت قرار می دهیم به طوری که سطح ظرف را بپوشاند و ظرف در تاریکی قرار گیرد. پس از طی این مدت رنگ را خارج می کنیم و سطح چسبنده محیط را روی یک صفحه شفاف (slide) قرار می دهیم و زیر اشعه ماورای بنفش Epifluorescence با درشت نمایی $100 \times$ و روغن ایمرسیون بررسی می کنیم (۱۹). در اکثر موارد برای استاندارد کردن سیستم، افزایش سطح سیتوپلاسم جهت آشکار کردن مایکوپلازما و نیز جستجوی مایکوپلاسمای سرم و دیگر مواد شیمیایی موجود در محیط کشت سلول از یک محیط کشت معرف یا نشان گر (Indicator) استفاده می شود.

این محیط کشت معرف به عنوان کنترل مثبت و منفی به کار می رود. هر چند برای تعدادی از آزمایشگاه های بالینی و تحقیقاتی رشد دادن مایکوپلازماها روی محیطهای کشت به عنوان کنترل مثبت غیرممکن است.

یک تیره نشان گر معمول، تیره سلولی کلیه میمون سبز آفریقایی یا تیره سلولی Vero است که نسبت سیتوپلاسم به هسته بالایی دارد و به عنوان مخزن استاندارد به کار می رود. مایکوپلازما روی این تیره سلولی به عنوان کنترل مثبت کشت داده می شوند (۱۹).

بررسی نتایج کشت

نیز جهت بررسی آلودگی با مایکوپلاسما در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی آزمایش می‌شوند. کنترل منفی در مورد هر دو محیط، یک محیط آماده نشده از همان نوع است. در صورت وجود آلودگی، مایکوپلاسماها رشد و توده سلولی ایجاد می‌کنند که این توده در محیط کشت قابل رویت (میکروسکوپی) است. از مشخصه‌های کلونی مایکوپلاسماها خالص فرم مشخص تخم مرغی شکل روی آگار است. لازم است توجه داشته باشیم گاهی کلونی‌های کاذب و یا تجمعات سلولی ممکن است با کلونی‌های مایکوپلاسما اشتباه شوند که *psudocoloni*ها از تشکیلات کریستالی به وجود می‌آیند و به وسیله رنگ *Dienes* رنگ نمی‌پذیرند. در صورتی که مایکوپلاسما با استفاده از این رنگ آبی می‌شود و این نکته وجه تمایز آنها است. از طرفی تجمعات سلولی و توده‌های کاذب با گذشت زمان افزایش اندازه ندارند. در صورتی که مایکوپلاسما به علت رشد باکتری با گذشت زمان بزرگتر می‌شود. توده‌های سلولی قارچی و باکتریایی نیز در رنگ آمیزی فوق بی‌رنگ باقی می‌مانند (۲۱).

PCR

PCR یک روش مهم و بسیار حساس و سریع به ویژه جهت آشکارسازی سطوح آلودگی بسیار پایین که به علت ممانعت از رشد مایکوپلاسماها توسط برخی آنتی‌بیوتیک‌ها ایجاد می‌شود؛ محسوب می‌شود. PCR با مشخص کردن ترادف ژنوم RNA ریبوزومی ۱۶S مایکوپلاسمایی و اکتولوپلاسمایی آلودگی را در صورت وجود محرز می‌کند.

روش کار بدین صورت است که ابتدا یک میلی‌لیتر از مایع روئی محیط کشت مورد آزمایش را در یک لوله از نوع *ependrof* می‌ریزیم درب آن را محکم می‌بندیم. این لوله را داخل یک لوله آزمایش پر از آب در حال جوشیدن می‌گذاریم و اجازه می‌دهیم به مدت ۵ دقیقه در حال جوشیدن باقی بماند. سپس لوله را بیرون می‌آوریم و در حرارت اتاق سرد می‌کنیم که نمونه حاصله یا برای استفاده فوری مصرف می‌شود و یا در ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد می‌شود. در مرحله بعدی به هر لوله حاوی نمونه مواد زیر را اضافه می‌کنیم:

- ۱۰ میکرو لیتر از بافر $10 \times$
 - ۱/۵ میکرو لیتر کلراید منیزیم *Maniuzium chloride*
 - ۵۰ picomol (pmol) از هر primer
 - ۰/۲ میلی متر داکسی نوکلئوتید تری فسفات *Deoxy nucleotide 3 phosphate*
 - ۰/۲ میکرون آنزیم *Taq*
- سپس حجم آن را با آب دو بار تقطیر به ۹۰ میکرو لیتر می‌رسانیم. همه مواد باید در یخ نگهداری شوند و نمونه همراه با کنترل مثبت و منفی آزمایش شود. لازم به ذکر است که کنترل مثبت همان کشت سلول‌های *Vero* است.

۱۰ میکرو لیتر از این مخلوط را به لوله‌های مخصوص اضافه و خوب

رنگ فلوروکروم *Hoechst 33258* قادر به اتصال اختصاصی به DNA است. برای بررسی نتیجه، کشت‌های مورد آزمایش را زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی می‌کنیم. در کشت‌های غیر آلوده فقط فلورسانس هسته سلول‌ها (محل وجود DNA) در یک پس زمینه تیره مشخص است. اما کشت‌های آلوده به مایکوپلاسما دارای فلورسانس خارج هسته‌ای ناشی از اتصال رنگ به DNA مایکوپلاسما هستند. مایکوپلاسما ممکن است زیر میکروسکوپ به صورت اشکال رشته‌ای، شاخه‌ای (مرحله رشد لگاریتمی باکتری) و یا گرد و کروی (کشت کهنه) دیده شود. گاهی فلورسانس خارج هسته‌ای توسط هسته‌های خرد شده سلول‌های تخریب شده ایجاد می‌شود که نباید با مایکوپلاسما اشتباه شود. برای جلوگیری از این اشتباه بهتر است نمونه‌ها (مایع روئی کشت یک تیره سلولی) قبل از انجام آزمایش توسط یک صافی غشایی با قطر سوراخ‌هایی برابر صافی شوند که ۹۰ درصد مایکوپلاسما در این صافی به دام می‌افتد و ۱۰ درصد مایکوپلاسمای عبور کرده توسط رنگ آمیزی DNA مشخص می‌شود. این روش قادر به نشان دادن مقادیر بسیار کم مایکوپلاسما نیز هست. نکته دیگر اینکه در مورد ایجاد نتایج مثبت کاذب توسط خرده‌های هسته یا آلودگی با سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها، فلورسانس‌های خارج هسته‌ای از نظر اندازه متنوع‌اند و بسیار بیشتر و بزرگ‌تر از آلودگی با مایکوپلاسما هستند. صفحات شفاف مثبت و منفی از نظر آلودگی برای چندین هفته در تاریکی پایدار می‌ماند. در این روش نتایج سریع به دست می‌آید و همچنین جهت گونه غیر قابل کشت *M. hyorhinis* روش قابل استنادی محسوب می‌شود (۲۰).

کشت

نمونه‌های موجود در بانک‌های سلولی خصوصاً مواردی که با سرم حیواناتی مانند سرم خوک یا سرم اسب سر و کار داریم را می‌توان جهت کنترل کیفی کشت داد. بدین صورت که با استفاده از یک سوپ استریل مقداری از سلول‌های چسبنده را در محیط کشت *FBS* معلق می‌کنیم به طوری که غلظت سلولی 5×10^5 سلول در 1 ml ایجاد گردد. ابتدا این سلول‌ها را توسط یکی از روش‌هایی که قبلاً توضیح داده شد از نظر قدرت حیات بررسی می‌کنیم. سپس با ۰/۱ میلی لیتر از این نمونه یک محیط آگار و با ۰/۲ میلی لیتر از نمونه فوق یک محیط آبگوشت تهیه می‌کنیم. سپس ظروف کشت را در وضعیت بی‌هوای در دمای 36 ± 1 درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز نگهداری می‌کنیم. روزهای ۷ و ۱۴ پس از کشت از محیط‌های آگار و آبگوشت محیط‌های تجدید کشت (*sub cultures*) تهیه و در ۳۶ درجه سانتی‌گراد به طور بی‌هوای نگهداری می‌کنیم. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پلیت‌های آگار را با میکروسکوپ معکوس و با درشت‌نمایی $100 \times$ و $400 \times$ بررسی می‌کنیم. کشت‌های مثبت ممکن است به عنوان کنترل مثبت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

در مورد هر دو محیط آگار و آبگوشت قبل از استفاده، خود محیط

مخلوط و سپس لوله را سانتریفیوژ می‌کنیم. در مرحله بعد دستگاه چرخه دهنده (Thermo cycler) قادر به ایجاد چرخه‌های زمانی لازم است که عبارتند از: ۱ ساعت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ ساعت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد که این دوره‌ها ۴۰ مرتبه تکرار می‌گردد.

سپس محصول را روی ژل آگارز ۲ درصد پخش و به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۰۰ ولت الکتروفورز می‌کنیم. سپس ژل حاصله را با رنگ اتیدیوم برومید (Etidium Bromide) در ۱ درصد EB ۱۰۰ میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی می‌کنیم. در صورت وجود ژن rRNA16s آلودگی با مایکوپلازما اثبات می‌شود. روش‌های جدید PCR قادر به آشکارسازی زیرگونه‌های مایکوپلازما نیز هستند. تفاوت در روش‌های PCR مربوط به ماشین cycler (ماشین چرخه دهنده) است که در زمان نگهداری در دمای ۳۷ درجه و نسبت سرد و گرم کردن در ماشین‌های مختلف ممکن است تغییر کند. لازم به ذکر است که جهت کنترل کیفی محیط‌های کشت سلولی، PCR بهترین روش است و نسبت به سایر موارد بانک‌های سلولی، محیط کشت اولین انتخاب جهت PCR است (۲۲، ۲۳).

باکتری‌ها و قارچ‌ها

از دیگر موارد موجود جهت کنترل کیفی بانک‌های سلولی، بررسی آلودگی با باکتری‌ها و قارچ‌ها است. خصوصاً در مواردی که باکشت سلولی بدون مصرف آنتی‌بیوتیک سر و کار داریم احتمال این آلودگی زیاد است. گاهی باکتری‌ها در کشت سلولی به کندی رشد می‌کنند و در مراحل اولیه قابل تشخیص نیستند که با توجه به مراحل زیر می‌توان آلودگی‌ها را آشکار ساخت:

استفاده از میکروسکوپ معکوس و در صورت امکان میکروسکوپ تنظیم‌کننده دو مرحله‌ای عبور نور (Phase contrast) و بررسی دقیق تک تک ظروف کشت سلولی جهت بررسی وجود باکتری یا قارچ در محیط کشت خصوصاً در مواردی که تولید مقادیر بالای محصول از محیط‌های کشت سلولی مدنظر باشد (۲۴).

اگر محیط‌های کشت سلولی از منطقه‌ای به منطقه دیگر حمل شوند باید نمونه‌های مایع از کشت‌ها جدا و جهت بررسی آلودگی با میکروسکوپ‌های با قدرت بالا فرستاده شود. اقدام بعدی تهیه گسترش از محیط کشت، ثابت کردن گسترش با گرما و رنگ‌آمیزی با یکی از روش‌های رنگ‌آمیزی موجود و مشاهده نمونه رنگ‌آمیزی شده با روغن ایمرسون جهت وجود آلودگی‌های باکتریایی یا قارچی و در پایان تهیه photomicrograph از آلودگی جهت پی بردن به جزئیات بیشتر مجموعه مواردی است که به صورت اولیه در بررسی میکروبی صورت می‌گیرد. البته این آزمایش‌های میکروسکوپی تنها برای آشکار کردن آلودگی‌های با مقادیر زیاد مناسب است و برخی آلودگی‌های اندک یا مخفی با یک مشاهده ساده قابل ردیابی نیستند و به آزمایش‌های پیچیده و گران‌تری نیاز است (۲۴). از جمله این آزمایش‌ها عبارتند از: استفاده

از کشت‌های تک لایه و سلول‌های معلق فاقد هر نوع آنتی‌بیوتیک. اگر محیطی مورد آزمایش است که قبلاً آنتی‌بیوتیک دریافت کرده است ابتدا مایع روی محیط را به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصله را در محیطی عاری از آنتی‌بیوتیک معلق می‌کنیم. سپس نمونه را ۳ بار با محیط فاقد آنتی‌بیوتیک شستشو می‌دهیم تا غلظت آنتی‌بیوتیک ممانعت‌کننده از بروز آلودگی به حداقل ممکن برسد. با استفاده از جدول یک محیط مناسب را انتخاب و ۰/۳ میلی‌لیتر از نمونه را در محیط به صورت یک حالت معلق سلولی درمی‌آوریم و با توجه به جدول یک، رشد می‌دهیم. و در روزهای ذکر شده در جدول، محیط را بررسی می‌کنیم.

در صورت وجود آلودگی، تجمع میکرو ارگانیسم‌های آلوده‌کننده روی محیط‌های جامد ظاهر می‌شود و در صورت استفاده از ظروف منقسم مایع، وجود آلودگی با بررسی شفافیت یا کدورت محیط مایع (کدر شدن در اثر حضور باکتری یا قارچ) ثابت می‌شود. برخی عوامل شایع موجود در آلودگی‌ها عبارتند از:

Escherichia coli, *pseudomonas aeruginosa*, *penicillium notatum*, *Bacteriodes distasonis*, *Micrococcus salviarius*, *Aspergillus niger* and *candida albicans*

اما در یک مطالعه، ۹ مورد آلودگی کشت‌های سلولی از آزمایشگاه‌های متفاوت در آمریکا با عاملی پنهان که از دید و آشکار شدن فرار می‌کنند، مشاهده شد که این ارگانیسم با رشد بسیار آهسته قادر به ظهور در محیط کشت پس از ۳ هفته گردید. این نمونه‌های مشکوک را روی محیط‌های آگار خون گوسفندی و آبگوشت Newyork City کشت دادند. پس از ۶ هفته نگهداری در ۳۷ درجه ارگانیسم ظاهر گردید که آنتی‌بیوتیک‌ها نیز بر این باکتری‌ها تنها اثر توقف رشد (Bactriostatic) داشته و فاقد اثر کشندگی (Bactericidal) هستند. با استفاده از آزمایش‌های تعیین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری مذکور احتمالاً یک کورینه باکتریوم مشخص شده است (۲۵).

ویروس‌ها

در پایان، محصولات باید از لحاظ اثرات آسیب‌زایی سلولی یا cytopathic ویروسی بررسی شوند. در این بررسی نمونه‌ها باید تا حد ممکن رقیق شوند و در کشت‌های سلول‌های دوتایی ویروسی و به مدت دو هفته مورد بررسی قرار گیرند. در مواردی که بررسی وجود سیتومگالو ویروس مطرح باشد نمونه تا ۴ هفته تحت بررسی قرار می‌گیرد. موارد مایع و پیکره‌های منهدم شده جهت بررسی از نظر آلودگی ویروسی به حیوانات تزریق و اثر وجود ویروس در بدن حیوان بررسی می‌شود.

ویروس‌های موجود در تیره‌های سلولی چونندگان با استفاده از تلقیح نمونه مشکوک به بدن حیواناتی چون موش، جین تخم مرغ، خوکچه هندی، خرگوش و میمون بررسی می‌شوند.

جدول ۱: شرایط مورد استفاده جهت محیط‌های کشت گوناگون

Test medium	Temperature	Aerobic state	Observation time (dys)
Blood agar with:			
Fresh defibrinated rabbit blood (5%)	37	Aerobic	14
Thioglycollate broth	37	Anaerobic	14
	26	Aerobic	14
Trypticase soy broth	37	Aerobic	14
	26		
Brain heart infusion broth	37	Aerobic	14
	26		
Sabouraud broth	37	Aerobic	21
	26		
YM broth	37	Aerobic	21
	26		
Nutrient broth with 2% yeast	37	Aerobic	21
	26		

اقداماتی جهت رفع و کنترل آلودگی

در صورتی که وجود هر یک از آلودگی‌های مایکوپلازما، باکتری یا قارچی در کشت سلولی محرز گردد، بهترین کار دور ریختن کشت، چک کردن مواد تشکیل دهنده کشت سلول از حیث آلودگی، گندزدایی کامل همه قفسه‌ها و سطوح کار و تهیه یک کشت تازه از موجودی ذخیره منجمد است. در مواردی که ارگانسیم آلوده کننده قادر به تشکیل هاگ (spore) باشد و یا نمونه مورد مطالعه بدون هیچ ذخیره قابل جایگزین و تنها نمونه موجود باشد از درمان با آنتی‌بیوتیک جهت کاهش آلودگی استفاده می‌شود.

قبل از پرداختن به چگونگی بهره‌گیری از آنتی‌بیوتیک درمانی لازم است یادآور شویم کلیه کشت‌ها و مواد آلوده باید قبل از دور ریختن اتوکلا شود (۲۸). با توجه به جداول دو، سه و چهار ابتدا آنتی‌بیوتیک مناسب را انتخاب می‌کنیم:

جدول ۳: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت قارچ‌ها

Amphotericin B (Sigma)	2.5 mg 1 ⁻¹
Ketaconazole (Sigma)	10 mg 1 ⁻¹
Nystatin (Sigma)	50mg 1 ⁻¹

جدول ۴: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت مایکوپلازما

Sigma)Ciprofloxacin (Bayer)	20 mg 1 ⁻¹
MRA (Mycoplasma Removal Agent- ICN-Flow)	0.5 mg 1 ⁻¹

پس از تهیه محیط کشت سلول، سلول‌ها را در حضور آنتی‌بیوتیک انتخاب شده به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز کشت می‌دهیم. اضافه کردن آنتی‌بیوتیک باید بر روی بیشترین رقت سلولی انجام گیرد که در آن رقت هنوز رشد سلولی رخ می‌دهد. پس از این مدت با توجه به روش‌های ذکر شده قبلی، محیط را از لحاظ وجود آلودگی بررسی می‌کنیم. اگر هنوز آلودگی وجود داشته باشد، مصرف آنتی‌بیوتیک موفقیت‌آمیز نبوده و آنتی‌بیوتیک دیگری استفاده می‌شود. تست‌های غربال‌گری آلودگی جهت باکتری و قارچ در روزهای پنجم تا هفتم کشت و جهت مایکوپلازما در روزهای ۲۵ تا ۳۰ با یک روش مناسب

جستجوی آنتی‌بادی تولید شده در بدن حیوان با آزمایش‌های RAP (آنتی‌بادی در رت)، MAP (آنتی‌بادی در موش) و HAP (آنتی‌بادی در هامستر) قابل پیگیری است.

ویروس‌های بیماری‌زای موجود در تیره‌های سلولی انسانی از جمله Hepatitis B virus, cytomegalovirus virus, Eptiten Bar virus, Hepatitis C virus

با توجه به منبع بافت و تاریخچه پزشکی بیماری که تیره سلولی از آن مشتق شده، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۲۶). آزمایش‌های تکمیلی جهت آشکارسازی آلودگی ویروسی عبارتند از:

استفاده از میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (Transmission Electron Microscope: TEM)

روش ترانس کریپتاز معکوس (Reverse Transcriptase) بر روی محیط‌های حاوی رسوب سانتریفیوژ با دور بالای نمونه‌ها (۱ ساعت در ۱۲۵۰۰۰ گرم)

روش عفونت‌زایی با تلقیح به حیوان آزمایشگاهی مناسب و بررسی اثر حضور ویروس (۲۷)

- Tumorigenicity test

جدول ۲: آنتی‌بیوتیک‌های مناسب جهت باکتری‌ها

Antibiotic	Working concentration	Gram-positive Bacteria	Gram-negative bacteria
Ampicillin	100 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Cephalothin	100 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Gentamicin	50 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Kanamycin	100 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Neomycin	50 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Penicillin V	100 mg 1 ⁻¹		
Polymyxin B	50 mg 1 ⁻¹		✓
Streptomycin	100 mg 1 ⁻¹	✓	✓
Tetracycline	10 mg 1 ⁻¹	✓	✓

همان‌طور که قبلاً اشاره شد امروزه این روش کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد و فقط توسط PCR، ژن‌های معیوب ردیابی می‌شوند.

از آنتی‌بیوتیک پس از آنتی‌بیوتیک درمانی است. چرا که در بسیاری موارد ممکن است سطح آلودگی کمتر از حد قابل آشکار سازی باشد و ادامه رشد چنین سلول‌هایی در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک باعث گسترش رشد مایکوپلاسماها تا حد قابل آشکار می‌گردد. استفاده از روش‌های دیگر مثل استفاده از موش‌های nud بدون تیموس، خرگوش یا سرم خوکچه هندی و نیز استفاده از ترکیبات مشابه اسیدنوکلئیک هنوز در درجه متغیری از موفقیت قرار دارند (۲۹، ۳۰).

در پایان لازم به ذکر است که چندین مرکز بانک سلولی معتبر در جهان وجود دارد که تمامی برنامه‌های مدون کنترل کیفی سلول‌های موجود را به طور دقیق انجام می‌دهند و سپس سلول‌های کنترل شده را به سایر مراکز ارسال می‌کنند.

انجام می‌گیرد. بهتر است با روش‌های تعیین حساسیت مناسب‌ترین آنتی‌بیوتیکی را انتخاب کنیم که با کمترین غلظت قادر به اثر بر عامل آلوده کننده باشد (۲۹).

در مورد مایکوپلاسما با توجه به مقاومت این باکتری به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز حضور سطوح پایین مایکوپلاسما، در برخی موارد قابل ردیابی با روش‌های موجود نیست که اهمیت انتخاب آنتی‌بیوتیک بیشتر می‌شود. تاریخچه آنتی‌بیوتیک درمانی مایکوپلاسما حاکی از آن است که Tiasolin، Monocyclin و Tylosin نتیجه بهتری نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. امروزه آنتی‌بیوتیک‌های ciprofloxacin و MRA به عنوان درمان‌گر سلول‌های آلوده به مایکوپلاسما معرفی شده‌اند. اما نکته مهم در اهمیت نگهداری سالم سلول‌ها در محیط عاری

References

- Holland NT, Pflieger L, Berger E, Ho A, Bastacki M. Molecular epidemiology biomarkers – sample collection and processing considerations. *Toxicology and Applied pharmacology* 2005; 206: 261-268
- Albertini RJ, Anderson D, Dauglas CR, Hagmer I, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppah Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A. Ipcs guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International program on chemicals safety. Mutat. Res* 2000; 463(2): 111-113
- Bingham Riboli E. Ditant cancer- The European prospective investigataion into cancer and nutrition. *Nat. Rev, Cancer* 2004; 4(3): 206-215
- Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Matat. Res.* 2003; 543(3): 217-234
- Eskenazi B, Bradman A, Gladstone E, Jaramillo S, Birch K, Holland NT. Chamaccos a longtiudinal birth cohort study: lessons from the s.J. *child.Health* 2003; (1): 3-27
- Duramad P. McMahan CW, Habbard A, Holland N. Flowcytometric detection of intracelluar Th/Th cytokines using whole blood. validation of immunological marker for use in epidomological studies. *cancer EpldemITSP Biomarkerprej.* 2004; 13(9): 1452-1458
- Wise KS, crassel GH. Modification of amino acid concentrations induced by myco plasma in cell culture medium. *Nature new biology,* 1971; 232: 242- 244
- Wiley J. Sons cell and Tissue culture for medical Research, Inc, 2005; 48-65
- Avadi SJ, Mosaffa N, Taheri S, Karimzadeh K. The effect of Glycation of culturc medium on phago cytic and

- respiratory brust of peritoneal macro phages from Balb/c mice. *Immunology J Montral,* 2004; 180-184
- Doyle A, Griffiths JB. Cell and Tissue culture: laboratory procedures. Wiley 1998; 720- 725
- Ulloa F, Montoya C, Verfailie M, wei- shov hu. Culture system of pluripotential stemcells. *Journal of Bio Science and Bio engineering.* 2005; 100(1): 12- 27
- Seag Heo D, Gahopark J, Hata K, Day R, Ronald B, Herbermanand Th. Evaluation of tetra zolium based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human anti tumor cy totoxicity cancer. *Res,* 1990; 50: 3681-3690
- Zymozan Z, Ghasemy B, Farrokhi F, Miraghasi A, Ejaz Ahmad N. Mosaffa Release of s-fas-l buy monocytes and lymphocytes Triggered by Betaglukan and zymozan. *Iranian Jurnal of Immounology,* 2006; 3: 121-125
- Mossafa N, Labibi F. Isolation and purification of natural killer cell subpopulation using supernatant culture of mononuclear leukocyte culture by pIIA and evaluation of cytotoxic activity" *The journal of faculty medicine.* 1999; 1: 9-16
- Babich H. B oren freunde, Neutral red assay for toxicology in vitro. In: Watson RR (ed) *Invitro methods in Toxicology,* 1992; 17: 237- 251
- Crarity MC, Phillips CY, Vaidya A. Mycoplasmal infection of lymphoyte cultures": Infection with M. salivarium *In vitro,* 1980; 16: 346- 356
- Ohno T, Takeuchi M. Test for mycoplasma contamination "Standardized protocols for quality control of animal cell lines. Re port from J TCA cell bank committ. *Tissue culture Research communica tions* 9: suppl. 1990; 9-11

18. Freshney RI. culture of Animal cells- A manual of basic Techniques, 2 end edn. Alan Rliss Inc, 1987
 19. Wyeth C, Alliknets E, Nichols Amy H, Plumm Er Dorothy J. Serum- free vero cell banking process. *Ipc* (1-7), 2004; 1210- 1219
 20. Levine Ex, Thomas I. Altered nucleic acid meta bolism in human cell cultures infected with myco plasma proceedings of the national Academy of sciences of the USA 60, 1968; 583- 589
 21. Rottims D. Sub version and exploitation of host cells by mycopalmmas, *Trends microbiol.* 1998; 6: 436-440
 22. Van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galamajm Kissing J, Bolske G, Van Der Logtjt, Mechers WJ. Detection of mycoplasma in cell cultures by a mycoplasma group specific pcr. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 149-152
 23. Prucker JM, Ades EW. Detection by polymerase chain reaction of all common mycoplasma ina cell culture facility, *Pathobiology.* 1995; 63: 9-11
 24. Cour I, Max Well G, Hay RJ. Tests for bacterial and fungal conta minats in cell cultures as applied at the ATCC. *Tissue culture Association manual,* 1979; 5: 1157-1190
 25. Wi NN, Reichman DM, Gunter ME. Epidemiologic issues in the design and use of biologic specimentbank. *Epidemiol. Rev* 12, 1990; 56-70
 26. Mathew A, Van Buskrik R, Baust J. Improved hypothermic preservation of human renal cells through supression of both apoptosis and necrosis. *cell preserv. Technol.* 2003; 1(4): 239-253
 27. Schulte PA, Perera FP. *Molecular Epidemiology principles and practices.* Academic press, San Diegor. 1993; 5: 153-159
 28. Marcusm L, Nattenberg A, Rohens MW. Siective killing of mycoplasma from contminated cells in cell culture. *Nature* 1980; 285: 659-699
 29. Van Diggeln OP, Shins Philips DM. Reduction ic cellular tumorgencity after mycoplasma infection and elimination of myco plasma from infected culture by passage in nud mice. *Cancer Research* 1977; 37: 2680-2687
 30. Mowles JM. The use of cipro floxacine for the eli mination of myco plasma from naturally infected cell lines. *Otech nology* 1988; 1: 355-358
-