مقاله علمی

۱- احسان نیکبخت سرداری خیاوی: کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
۲- مهسا کریمی: کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

روش های تشخیص مایکوپلاسما و پیشگیری از آلودگی کشت های سلولی با آن

مایکوپلاسماها خیلی کوچک هستند و به سختی می توان این باکتری ها را که می توانند کشت های سلولی را آلوده کنند، شناسایی کرد. کشت سلولی به طور فزاینده ای هم در تحقیقات و هم در بیوتکنولوژی استفاده می شود. در حالی که آنها بینش ارزشمندی در مورد فیزیولوژی سلولی ارائه می دهند و جایگزین خوبی برای مدل های حیوانی هستند، در دهه های اخیر ثابت شده است که در برابر آلودگی آسیب پذیر هستند. مایکوپلاسما معمولاً کشت های سلولی را در انکوباتورها آلوده می کند و این آلودگی به راحتی بین کشت ها پخش می شود. بنابراین آلودگی مایکوپلاسما در بیشترآزمایشگاه ها به عنوان یک موضوع بسیار جدی در نظر گرفته می شود.

فیزیولوژی مایکوپلاسما

بارزترین ویژگی مایکوپلاسما این است که آنها فاقد دیواره سلولی سفت و سخت هستند. با توجه به اینکه بسیاری از آنتی بیوتیک ها با جلوگیری از سنتز دیواره سلولی عمل می کنند، مایکوپلاسما به طور ذاتی در برابر چنین درمانی مصون است. آنها همچنین از کوچک‌ترین باکتری‌هایی هستند که می توانند از فیلترهای باکتریایی عبور کنند و این فیلترها برای جلوگیری از گسترش باکتری استفاده می‌شود. قبلاً اعتقاد بر این بود که مایکوپلاسما فقط در سطح سلول های یوکاریوتی وجود دارد، اما آنها به گونه ی داخل سلولی هم کشف شده اند. اکثریت در خارج سلول قرار دارند، با این حال، گونه های خاصی در گرانولوسیت ها و مونوسیت ها، پس از فاگوسیتوز، و همچنین در داخل سلول های اپیتلیال از طریق مسیرهای غیر فاگوسیتوتیک کشف شده اند. استقرار گاه به گاه درون سلولی ممکن است آنها را از درمان های مایکوپلاسما سیدال محافظت کند.

تشخیص مایکوپلاسما در کشت سلولی

روش‌های بی‌شماری برای تشخیص مایکوپلاسما در کشت سلولی وجود دارد. برخی از این موارد غیراختصاصی هستند، مانند فلوروکروم های متصل شونده به DNA، لکه های بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی. قبل از این رویکردها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، رنگ‌آمیزی DNA و کشت‌های میکروبیولوژیکی روش‌های رایج مورد استفاده بودند.

رنگ آمیزی DNA مایکوپلاسما شامل یک DNA متصل به رنگ است که می تواند لکه های رشد مایکوپلاسما را نشان دهد. اگرچه این روش ارزان و سریع است، اما دقیق نیست وچندان مورد توجه نیست. ویژگی PCR جذاب است، زیرا دانستن نوع مایکوپلاسمایی که کشت سلولی با آن آلوده شده است می تواند برای روش های پیشگیری در آینده مفید باشد. برای چندین دهه پیش از پیدایش PCR، سنجش کلنی میکروبیولوژیکی استاندارد طلایی برای تشخیص مایکوپلاسما بود.

در طی سنجش کلنی، نمونه‌های کشت سلولی ۴ تا ۷ روز پس از تلقیح در مایکوپلاسما براث و روی آگار قرار داده می‌شوند.

آنها ترجیحا به صورت هوازی برای حمایت از رشد نگهداری می شوند.اگر مایکوپلاسما وجود داشته باشد، کلونی هایی به شکل تخم مرغ منعقد شده تشکیل می دهد

(دو دایره قابل مشاهده، یکی در داخل دیگری). از مزایای این روش می توان به سهولت استفاده و شناسایی بصری کلنی ها اشاره کرد. با این حال، زمان انکوباسیون مورد نیاز بسیار طولانی است (۴-۷ روز)، و بازرسی بصری وابسته به کارکنان مجرب است. همچنین ممکن است این روش برخی از عفونت های مایکوپلاسما را از دست بدهد، زیرا نمی توان همه گونه ها را با موفقیت کشت داد.

- در سال ۱۹۸۹ اولین بارPCR برای شناسایی مایکوپلاسما مورد استفاده قرار گرفت. مایکوپلاسماداری جایگاه‌های خاصی از ژنوم خود است که به شدت محافظت شده است، به این معنی که پرایمرهای همکانی برای شناسایی هر گونه مایکوپلاسما وجود دارد. برخی از آنها حتی برای شناسایی هر گونه پروکاریوت قابل استفاده هستند. اینها هنگام غربالگری از نظر آلودگی مناسب هستند، اما مناطق بین ژنی نیز وجود دارد (16S-23S) که می تواند هم برای تشخیص و هم برای شناسایی استفاده شود. با وجود حساسیت بالای PCR، گاهی اوقات اشتباهاتی نیز وجود دارد. از آنجایی که PCR بسیار حساس است، به دلیل آلودگی DNA در معرض خطر تولید مثبت کاذب است. همچنین می تواند به دلیل مهار polymerase Taq توسط خود نمونه، منفی کاذب بدهد، با این حال، PCR موثرترین و با حساسیت بالاترین روش موجود برای تشخیص مایکوپلاسما در کشت سلولی است.

جلوگیری از آلودگی مایکوپلاسما

هنگامی که یک کشت در آزمایشگاه آلوده شد، مایکوپلاسما می تواند به کشت های دیگر سرایت کند. این یکی از شایع ترین منابع آلودگی مایکوپلاسما به همراه سرم آلوده و آلودگی کارکنان آزمایشگاه است. بنابراین، اکثر روش های پیشگیری حول این منابع متمرکز می شوند:

- مایکوپلاسماها به بیشترضدعفونی کننده حساس هستند. به همین دلیل، کارهای کشت سلول استریل باید در یک هود بخار با سطوح و دستگاه‌های ضدعفونی‌شده انجام شود. به طور خاص، یک هود بخار زیستی با جریان عمودی لامینار توصیه می‌شود.
- تمیز کردن منظم سایر سطوح در آزمایشگاه، مانند سینک و کف، باید انجام شود تا آلودگی محیطی به حداقل برسد.
- برای جلوگیری از آلوده شدن سرم یا سایر معرف‌ها، این معرف‌ها فقط باید از تامین‌کنندگان قابل اعتماد خریداری شوند.
- تامین کنندگان باید محصولات خود را از نظر آلودگی به مایکوپلاسما آزمایش کنند و آزمایشگاه دریافت کننده تشویق می شود محصولات دریافتی را تا زمانی که وضعیت آلودگی آنها مشخص شود قرنطینه کند.
- از بین بردن آلودگی مایکوپلاسمایی موجود دشوار است. آنها نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها حساس نیستند، نمی توان آنها را فیلتر کرد، و حتی گاهی اوقات می توانند "پنهان شوند". استفاده منظم و گسترده از آنتی بیوتیک هایی که مایکوپلاسما را هدف قرار می دهند، به دلیل ترس از مقاومت باکتریایی توصیه نمی شود.
- موثرترین و مطمئن ترین راه برای جلوگیری از انتشار مایکوپلاسما، حذف نمونه هایی است که در آن یافت می شود.

منبع:

This is a translation into Farsi of an article originally published in English :Ryding ,Sara ,Mycoplasma Detection and Prevention in Cell Cultures .Available from https://www.news-medical.net/life-sciences, Last Updated: Feb 26, 2019.