ورقة بحثية مجلة مفتوحة الوصول

التلوث في مزارع الخلايا

نغم بربر*، نور مصطفى** د. نتالي موسى***

*(كلية الصيدلة، جامعة المنارة البريد الإلكتروني: noga2468@gmail.com)

**(كلية الصيدلة، جامعة المنارة البريد الإلكتروني: nourruba888@gmail.com)

***(كلية الصيدلة، جامعة المنارة البريد الإلكتروني: Nathali.moussa@manara.edu.sy)

الملخص

يُعد تلوث مزارع الخلايا من أكثر المشاكل شيوعاً في مختبرات زراعة الخلايا، ويؤدي أحياناً إلى عواقب وخيمة ، و تُعد البكتيريا نظراً لانتشارها وحجمها ومعدلات نموها السريعة، إلى جانب الخمائر والعفن، أكثر الملوثات البيولوجية شيوعاً في مزارع الخلايا، أما أخطر هذه المشاكل فهي عدوى الميكوبلازما، لأن هذه الكائنات الدقيقة خفية، ويعتبر عامل الخطر الأول للتلوث هو الخطأ البشري وعدم وجود تدريب على ممارسات العمل المعقمة ، وفي حين أنه من المستحيل القضاء على التلوث تماماً، إلا أنه من الممكن الحد من تكراره وخطورته من خلال التوصل إلى فهم دقيق لمصادره واتباع تقنيات تعقيم جيدة، وفي سبيل التوصل إلى ذلك تقدم هذه الورقة البحثية لمحة عامة عن الأنواع الرئيسية للتلوث البيولوجي.

كلمات مفتاحية –مزارع الخلايا، الميكوبلازما، ماكروليد، تتراسكلين، كينولون

ABSTRACT

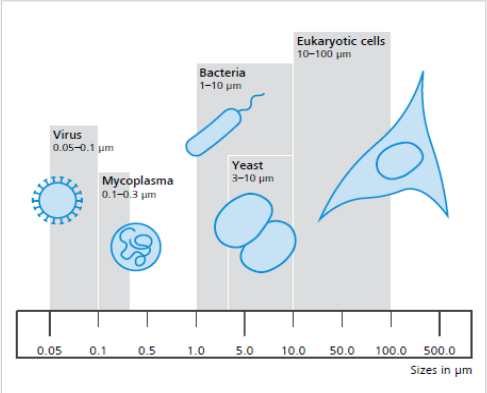
Contamination of cell cultures is one of the most common problems in cell culture laboratories, sometimes leading to serious consequences. Due to their ubiquity, size, and rapid growth rates, bacteria, along with yeasts and molds, are the most common biological contaminants in cell cultures. The most serious of these problems is mycoplasma infection, since these microorganisms are subtle. The primary risk factor for contamination is human error and a lack of training in sterile work practices. While it is impossible to eliminate contamination entirely, it is possible to reduce its frequency and seriousness by gaining a thorough understanding of their sources and by following good aseptic technique. To achieve this, this paper provides an overview of the main types of biological contamination.

Keywords: Cell culture, mycoplasma, Macrolide, Tetracycline, Quinolone

I- مقدمة

يمكن تقسيم ملوثات مزارع الخلايا إلى فئتين رئيسيتين: الملوثات الكيميائية: مثل الشوائب في الوسط، والأمصال، والماء، والسموم الداخلية، والمذِّنات، والمنظفات، والملوثات البيولوجية: مثل البكتيريا، والعفن، والخمائر، والفيروسات، والميكوبلازما، بالإضافة إلى التلوث المتبادل بسلالات خلوية أخرى [1] ، حيث يمكن أن تغُيّر هذه العوامل البيولوجية النمط الظاهري والنمط الجيني لسلالة الخلايا المزروعة من خلال التنافس على العناصر الغذائية، وتخليق نواتج ثانوية قلوية أو حمضية أو سامة، والتداخل المحتمل للمكونات الفيروسية مع جينوم مزرعة الخلايا. [2]

ويُعدّ التلوث بالبكتيريا والفطريات والخمائر من أكثر أنواع التلوث شيوعاً في مزارع الخلايا، إذ تحيط بنا في كل مكان وفي كل زمان، وكذلك كونها لا تواجه أي منافسة على العناصر الغذائية في ظل ظروف الزراعة المثالية، مما يُزيل جميع العوائق التي تحول دون نموها بحرية. [3]



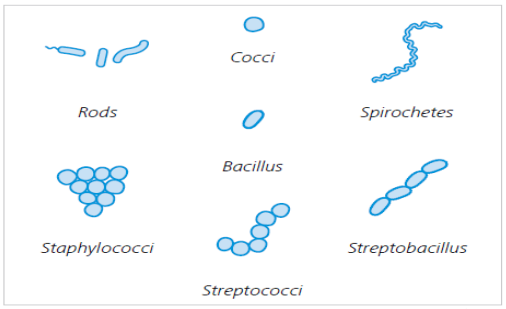
الشكل(1) مقارنة حجمية بين مختلف أنواع التلوثات في مزارع الخلايا البيولوجية (الحجم بالميكرومتر) [3]

II- التلوث بالبكتريا

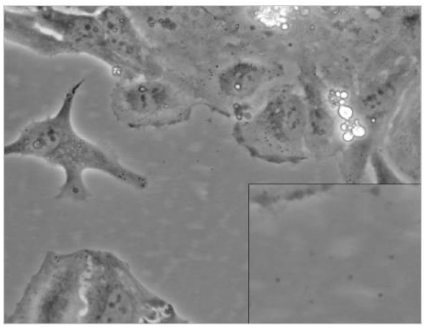
البكتيريا مجموعة كبيرة ومنتشرة من الكائنات الحية الدقيقة وحيدة الخلية، يبلغ قطرها عادةً بضعة ميكرومترات، ويمكن أن تتخذ أشكالاً مختلفة، تتنوع من المكورات إلى العصيات و الأشكال الحلزونية، يمكن اكتشاف التلوث البكتيري بسهولة من خلال الفحص البصري للمزارع في غضون أيام قليلة من إصابتها؛ وعادةً ما تبدو المزارع المصابة غائمة (أي عكرة)، وأحياناً مع طبقة رقيقة على سطحها، كما يُلاحظ انخفاض مفاجئ في درجة حموضة وسط الزراعة [1] بسبب معدلات الأيض العالية للبكتيريا، وبالتالي يلاحظ تغيُّر لون الفينول الأحمر إلى الأصفر [2].

ويمكن تحديد الملوثات البكتيرية تحت المجهر من خلال شكلها، وقطرها الذي يتراوح بين 0.5 و1 ميكرومتر، وطولها الذي يصل إلى 20 ميكرومتر، وحركتها النشطة أو السلبية (الحركة الجزيئية البراونية) بين الخلايا في مزرعة الخلايا، كما يمكن أن توجد البكتيريا منفردة، أو في سلاسل من خليتين أو أكثر، أو في مجموعات. [3]

حيث تظهر البكتيريا كحبيبات صغيرة متحركة بين الخلايا تحت مجهر منخفض الطاقة، كما يمكن للمراقبة تحت مجهر عالي الطاقة تحديد الأشكال الخاصة للبكتيريا المنفردة [1]



الشكل (2)مورفولوجيا البكتريا [3]



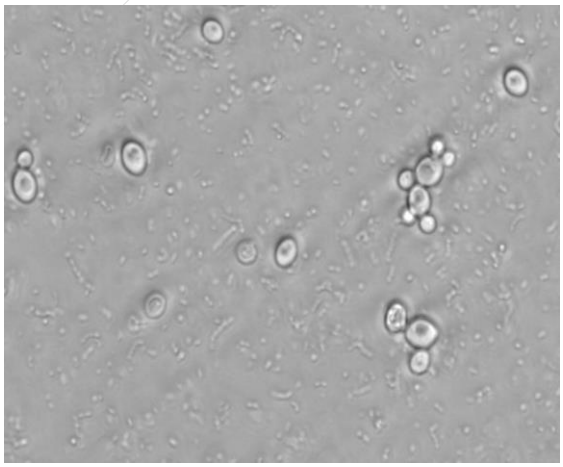
الشكل (3) مرحلة مبكرة من التلوث البكتيري [3]

III- التلوث بالخمائر

الخمائر كائنات دقيقة وحيدة الخلية حقيقية النواة، تنتمي إلى مملكة الفطريات، يتراوح حجمها بين بضعة ميكرومترات (عادةً) و40 ميكرومتراً (نادراً) [1] ، تتكاثر بالانشطار أو التبرعم [3].

ويحدث التلوث بالخمائر عادةً من خلال الهواء المحيط (تيارات الهواء في مختبر زراعة الخلايا) حيث يمكن أن تستوطن الخمائر في مرشحات الهواء، و تُطلق في الهواء المحيط على مدى فترة طويلة. وغالباً ما يحدث التلوث من خلال الغبار ووبر الحيوانات على ملابس المختبر. [3]

وتصبح المزارع الملوثة بالخمائر متعكرة، كما هو الحال مع التلوث البكتيري، خاصةً إذا كان التلوث في مرحلة متقدمة. أما الرقم الهيدروجيني (pH) للمزارع الملوثة بالخمائر فيتغير بشكل طفيف حتى يصبح التلوث كثيفاً، وهي المرحلة التي يرتفع الرقم الهيدروجيني عندها عادةً. تظهر الخمائر تحت المجهر كجسيمات بيضاوية أو كروية منفردة، قد تتبرعم منها جزيئات أصغر[1] ، أو في مجموعات من خليتين، أو على شكل سلاسل في الوسط بين الخلايا في مزرعة الخلايا [3].



الشكل (4)مزرعة خلايا ملوثة بالخمائر والبكتيريا و تظهر خلايا الخميرة الملوثة كجسيمات بيضاوية، تتبرعم منها جزيئات أصغر أثناء تكاثرها [3]

IV- التلوث بالعفن

فطريات العفن كائنات دقيقة حقيقية النواة تنتمي إلى مملكة الفطريات، تنمو على شكل خيوط متعددة الخلايا تُسمى الخيوط الفطرية. تحتوي شبكة متصلة من هذه الخيوط متعددة الخلايا على أنوية متطابقة وراثياً، وتُسمى مستعمرة أو فطريات. ويبقى الرقم الهيدروجيني للمزارع ثابتاً في المراحل الأولى من التلوث ، ثم يرتفع بسرعة مع ازدياد إصابة المزارع بالعدوى وتعكرها، كما هو الحال مع التلوث بالخمائر . تظهر الفطريات الفطرية عادةً تحت المجهر على شكل خيوط رفيعة تشبه خيوط العنكبوت، وأحيانًا على شكل كتل كثيفة من الأبواغ. تستطيع أبواغ العديد من أنواع العفن البقاء على قيد الحياة في بيئات قاسية وغير ملائمة في مرحلة خمولها، ثم تنشط عندما تواجه ظروف نمو مناسبة. [1]

V- التلوث بالفيروسات

الفيروسات عوامل مُعدية مجهرية تسيطر على آلية تكاثر الخلايا المضيفة، يجعل حجمها الصغير للغاية (حتى300 نانومتر [2]) من الصعب جداً اكتشافها في المزارع الخلوية، وإزالتها من الكواشف المستخدمة في مختبرات زراعة الخلايا. [1]

ولأن معظم الفيروسات تنتقي مضيفها وفقاً لشروط صارمة للغاية ، فإنها عادةً لا تؤثر سلباً على مزارع الخلايا من أنواع أخرى غير مضيفها. ومع ذلك، فإن استخدام مزارع الخلايا المصابة بالفيروسات قد يُشكل خطراً صحياً جسيماً على العاملين في المختبر، خاصةً إذا زُرعت خلايا بشرية أو خلايا من حيوانات رئيسية في المختبر[1]، حيث أن بعض أنواع الفيروسات قد تندمج في الجينوم الخلوي وتغُير النمط الظاهري للسلالة الخلوية المدروسة في حين أن بعض الأنواع الأخرى قد تحُدث تغيرات مورفولوجية في الخلايا المزروعة (تأثيرات خلوية) [2] مما يؤدي إلى دمج الجينوم الفيروسي كطليعة فيروس [4] ويشُكل إنتاج الفيروسات من هذه السلالات الخلوية خطراً محتملاً على مزارع الخلايا الأخرى في مختبرات الأبحاث (بسبب التلوث المتبادل)، أو على العاملين والمرضى في حالة إنتاج المواد البيولوجية القابلة للحقن (بسبب العدوى المحتملة) [4]

يمكن أن تنشأ العدوى الفيروسية من سلالات خلوية ملوثة، أو مواد خام ملوثة، أو من خلل في عملية الإنتاج والتنقية [4]، يمكن الكشف عن العدوى الفيروسية لمزارع الخلايا بواسطة المجهر الإلكتروني، أو التلوين المناعي باستخدام مجموعة من الأجسام المضادة، أو الاختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA، أو تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) باستخدام بادئات فيروسية مناسبة. [1,2]

VI- التلوث بالميكوبلازما

الميكوبلازما بكتيريا بسيطة تفتقر إلى جدار خلوي [1,3]، وبالتالي ليس لها شكل مميز [3]، وتُعتبر أصغر الكائنات الحية ذاتية التكاثر [1]. ونظراً لصغر حجمها (عادةً أقل من ميكرومتر واحد)، وكونها غير متحركة [2]، وافتقارها إلى جدار خلوي بالإضافة إلى التصاقها بسطح الخلية تكون الميكوبلازما غير مرئية للعين المجردة [5]، و يصعب اكتشافها حتى تصل إلى كثافات عالية جداً وتتسبب في تدهور مزرعة الخلايا، وغالباً ما لا تظهر أي علامات ظاهرة للعدوى حتى ذلك الحين [1]، حيث لا يمُكن اكتشافها بصرياً من خلال تعكر السائل أو تحت المجهر المقلوب [5]، إذ لا تُسبب الميكوبلازما تغيراً في درجة الحموضة في الوسط، ولا تُؤدي إلى تغيرات ملحوظة في الشكل أو السمية في الخلايا حقيقية النواة في المراحل المبكرة من التلوث، وهذا يعني أنه لا توجد أي علامات مبكرة للتلوث تقريباً، ومع ذلك، يمكن أن تُسبب الميكوبلازما، من بين أمور أخرى، حتى في حالات الأعداد القليلة: اضطرابات أيضية، وعيوباً في تخليق الأحماض النووية، وتغيرات كروموسومية، وتغيراً في قابلية انتقال الجينات [3]

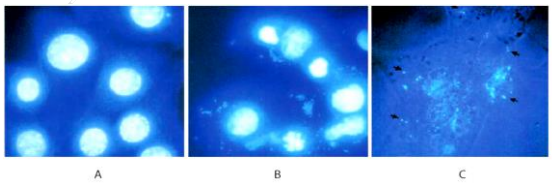
و بينما قد تبقى بعض الميكوبلازما بطيئة النمو في المزرعة دون أن تُسبب موت الخلايا، فإنها قد تُغير سلوك واستقلاب خلايا المضيف في مزرعة الخلايا، و قد تكشف عدوى الميكوبلازما المزمنة عن نفسها بانخفاض معدل تكاثر الخلايا، وانخفاض كثافة التشبع، والتراص في المزارع المُعلقة،

ومع ذلك، فإن الطريقة الوحيدة المؤكدة للكشف عن تلوث الميكوبلازما هي اختبار المزارع بشكل دوري باستخدام الصبغة الفلورية (على سبيل المثال، Hoechst 33258)، أو الاختبار الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA، أو تفاعل البوليميراز المتسلسل [1] باستخدام بادئات محددة لتسلسلات الحمض النووي الريبي S16 لأكثر سلالات الميكوبلازما شيوعاً [3]. ، أو باستخدام الصبغة المناعية، أو التصوير الشعاعي، أو الاختبارات الميكروبيولوجية. [1]

وتعتبر أكثر مصادر التلوث بالميكوبلازما شيوعاً :التلوث بفعل بشري (الملابس، شعر الرأس، وبر الحيوانات، السعال والعطس، التحدث في اتجاه منضدة التدفق الصفائحي) ، وتبدل موظفي المختبر بشكل متكرر، وعدم وجود ممارسات عمل معقمة أو كون هذه الممارسات غير كافية، و مزارع الخلايا ، والأمصال، والوسائط، والكواشف الملوثة بالفعل بالميكوبلازما [3]

i. جدول 1: آثار تلوث الميكوبلازما على مزارع الخلايا [5]

آثار تلوث الميكوبلازما على مزارع الخلايا [5]
زيادة الحساسية للموت الخلوي المبرمج
تشوهات الكروموسومات
تغير أنماط التعبير الجيني
تغيرات في قابلية استضداد غشاء الخلية
تثبيط نمو الخلايا
تجزئة الحمض النووي بسبب نوكليازات الميكوبلازما
تقويض إنتاج الفيروسات
تثبيط أيض الخلايا
انخفاض كفاءة نقل الجينات
موت الخلايا



شكل(5) صور مجهرية لخلايا مزروعة خالية من الميكوبلازما في (اللوحة a)، و خلايا ملوثة بالميكوبلازما (اللوحتان b و c).

ونظراً لعدم وجود "علامات خارجية" للتلوث المبكر، يُنصـــح عموماً باختبار مزرعة الخلايا بحثًاً عن الميكوبلازما على فترات منتظمة كإجراء احترازي (كل شهر إلى شهرين). [3]

VII- استخدام المضادات الحيوية

من الممارسات الشائعة في مختبرات الأبحاث استخدام المضادات الحيوية في مزارع الخلايا لتجنب التلوث الميكروبي [5] ، و للسيطرة على نمو الملوثات البكتيرية والفطرية [6].

و على الرغم من أن العديد من المضادات الحيوية ذات التأثيرات المثبطة المختلفة على التمثيل الغذائي الخلوي يمكن أن تكون مفيدة في القضاء على تلوث الميكوبلازما في مزارع الخلايا إلا أن هذا يعتمد على نوع المضاد الحيوي ، حيث تتراوح فعالية المضادات الحيوية في القضاء على الميكوبلازما بين 66 و 85 %، وتشمل هذه النسب المزارع التي ثُبِّطِ فيها نمو الخلايا حقيقية النواة، بينما يتم بعد العلاج بالمضادات الحيوية فقدان نسبة تتراوح بين 3 و 11 % من الخلايا التي تعاني أصلا من حالة سيئة وارتفاع في مستوى العدوى [5]

وتجدر الإشارة إلى ثلاث مجموعات من المضادات الحيوية التي أثبتت فعاليتها العالية ضد الميكوبلازما وهي الماكروليدات، التتراسيكلينات، والكينولونات (الجدول 2). حيث يتم استخدامها في ثلاث طرق مختلفة لعلاج الخلايا الملوثة بالميكوبلازما بالمضادات الحيوية:

a) استخدام الكينولونات كمركب مضاد حيوي واحد.

b) استخدام مضادين حيويين مختلفين مثل البلازموسين.

c) استخدام مزيج من المينوسيكلين (في مجموعة التتراسيكلين) والتياmولين (في مجموعة الماكروليد) في دورات متناوبة مع BM–Cyclin. [5]

ii. جدول 2 : المضادات الحيوية الفعالة ضد الميكوبلازما

المضادات الحيوية الفعالة ضد الميكوبلازما		
اسم العلامة التجارية	الاسم العام	فئة المضادات الحيوية
بي إم - سايكلين	تياmولين (BM-Cyclin 1)	الماكروليد
	مينوسايكلين (BM-Cyclin 2)	التيتراسايكلين
سيبروباي	سيبروفلوكساسين	الكينولون
بايتريل	إنروفلوكساسين	الكينولون
زاغام	سبارفلوكساسين	الكينولون
إم آر إيه	مجهول	الكينولون
بلازموسين	مجهول	التيتراسايكلين
	مجهول	الكينولون

VIII- آلية العمل

آلية عمل الماكروليدات والتتراسيكلينات هي تثبيط تخليق البروتين، ولكن كل منها ترتبط بوحدات فرعية مختلفة من الريبوسومات، في حين يثبط الكينولون تضاعف الحمض النووي عن طريق تثبيط جيراز gyrase البكتيريا. ومن المحتمل جداً أن تفلت الميكوبلازما من آلية التثبيط أو تصبح مقاومة لها في حالة استخدام نوع واحد فقط من المضادات الحيوية،

كما يمكن أن تؤدي مدة أو تركيز غير كافيين من العلاج بالمضادات الحيوية إلى مقاومتها، ويعود ذلك إلى بقاء الميكوبلازما المقاومة على قيد الحياة في وجود كمية قليلة من المضادات الحيوية، يمكن لهذه الميكوبلازما المقاومة أن تُبطل مفعول آلية التثبيط للمضاد الحيوي أو أن تُغير موقع هجومه، كما يمكنها ضخ المضاد الحيوي خارج الخلية. [5]

مع ذلك، لا ينبغي استخدام المضادات الحيوية بشكل روتيني في مزارع الخلايا [1,5]، وعوضاً عن ذلك، تلعب ممارسات التعقيم الجيدة دوراً هاماً في منع التلوث [5]، وذلك لأن استخدامها المستمر يُشجع على ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية، ويسمح باستمرار التلوث منخفض المستوى [1,2]، والذي قد يتطور إلى تلوث واسع النطاق بمجرد إزالة المضاد الحيوي من الوسط [1]، وقد يُخفي عدوى الميكوبلازما والبكتريا المقاومة و غيرها من الملوثات الخفية [1,7] ، كما يؤدي الإفراط في استخدام المضادات الحيوية إلى إخفاء رداءة تقنية التعقيم خلف هذه المضادات. [5]

علاوة على ذلك، قد تتفاعل بعض المضادات الحيوية مع الخلايا وتتداخل مع العمليات الخلوية قيد البحث. [1,2]

ويتعين عدم استخدام المضادات الحيوية إلا كحل أخير ، ولفترة قصيرة فقط، كما يجب إزالتها من الوسط في أسرع وقت ممكن، كذلك يجب الحفاظ على مزارع خالية من المضادات الحيوية بالتوازي مع استخدام المضادات الحيوية على المدى الطويل، كإجراء وقائي ضد العدوى الخفية. [1]

IX- الخلاصة

يمثل التلوث في مزارع الخلايا تحدياً جوهرياً أمام دقة النتائج و سلامة التجارب المخبرية في تطبيقات الزراعة الخلوية، إذ يمكن أن يؤدي إلى نتائج مضللة ، ويستهلك وقتاً وجهداً و موارد إضافية.

وتتنوع مصادر الملوثات بين كيميائية ناتجة عن المحاليل أو المواد الملوثة، و بيولوجية مثل البكتيريا، والعفن، والخمائر ، والفيروسات، والميكوبلازما، التي تنتج بشكل رئيسي عن الأخطاء البشرية وعدم الالتزام بممارسات العمل المعقمة.

ويعتبر الالتزام الصارم بشروط التعقيم وتطبيق بروتوكولات السلامة البيولوجية وتعزيز الوعي و التدريب على الممارسات المخبرية المتناسبة مع المخاطر ، العامل الأساسي للحد منها.

أما إدخال المضادات الحيوية ضمن أنظمة زراعة الخلايا مثل الماكروليدات، التتراسيكلينات، والكينولونات،

قد يشكل خط دفاع أساسي في مواجهة بعض الملوثات الميكروبية خصوصاً الميكوبلازما، غير أن الاعتماد المفرط عليها قد يخفي مظاهر التلوث الدقيقة ويؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة ، مما يجعل استخدامها أداة مساعدة لا بديلاً عن الإجراءات الوقائية الأساسية.

المراجع

[1] Thermo Fisher Scientific. Gibco Cell Culture Basics Handbook. 2002.
[2] Charis-P. Segeritz, Ludovic Vallier, Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro, Editor(s): Morteza Jalali, Francesca Y.L. Saldanha, Mehdi Jalali, Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press, 2017, Pages 151-172,
[3] Common forms of cell culture contamination and how to avoid them>
[4] Merten, O. W. (2002). Virus contaminations of cell cultures – A biotechnological view. Cytotechnology, 39(2), 91–116
[5] Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell J. 2012;13(4):203–212
[6] Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. Methods Enzymol. 1979;58:110-6
[7] Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. Materials and Methods, 3, 175