

Kontaminacje w zwierzęcych kulturach komórkowych¹⁾

ALEKSANDRA DUNISŁAWSKA, ARKADIUSZ PŁOWIEC, ANNA SŁAWIŃSKA, MARIA SIWEK

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Pracownia Genomiki, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Otrzymano 10.02.2015

Zaakceptowano 20.03.2015

Dunisławska A., Płowiec A., Sławińska A., Siwek M.

Contaminations in animal cell cultures

Summary

Contaminations of *in vitro* cell cultures constitute a serious threat to research. Infected cell lines may negatively influence the results of experiments, as well as expose the researchers to problems associated with the termination of the culture and decontamination of the laboratory. This paper presents the most common types of contaminations in experiments based on animal cell cultures. The key sign that may indicate infection is a decreased viability of the cell line and, in many cases, destruction of the cells. Depending on the type of infection, specific signs can be observed, and different methods for the detection of the infectious agent can be applied. Typical contaminations include bacterial and viral infections, sprouting fungal and yeasts cultures, or the presence of mycoplasma, endotoxin, protozoa, and invertebrates. In some cases, cross-contamination may occur, in which a cell culture is infected by another cell line. The main source of contaminations is an inappropriate implementation of good laboratory practices by laboratory personnel, as well as the use of non-sterile reagents, plasticware and CO₂ incubators. The most common method of fighting cell line infections is the elimination of the infected cell culture and decontamination of the laboratory. In working with cell cultures, it is necessary to observe the rules of sterile work and to know the sources and signs of infection to effectively mitigate the threat.

Keywords: contamination, cell culture, animal cell lines

Hodowle komórkowe *in vitro* znalazły szerokie zastosowanie w biotechnologii, farmacji oraz medycynie, gdzie stanowią główne narzędzie do badań (1, 24, 27). Do tych celów wykorzystywane są odpowiednio przygotowane i wyprowadzone z różnych tkanek linie komórkowe, zawierające dzielące się komórki, pochodzące z wielokomórkowego organizmu (49). Linie komórkowe powstają na bazie hodowli pierwotnych, tworzonych z komórek i tkanek pobranych bezpośrednio od osobnika i przeniesionych do sterylnego naczynia hodowlanego (30). Prowadząc hodowlę *in vitro*, nadrzędnym celem jest utrzymanie żywotności i odpowiedniej liczebności komórek oraz zapobieganie kontaminacjom (49). Zapewnienie ciągłości linii komórek adherentnych możliwe jest dzięki regularnym pasażom przez oddzielanie komórek od podłoża za pomocą trypsyny, proteazy lub środka chelatującego, a następnie rozdzielenie ich do naczyń hodowlanych.

¹⁾ Praca wykonana w ramach projektów badawczych NN311 558640 pt. „Analiza mutacji SNP w obrębie genów kandydujących związanych z nieswoistością i swoistością odpowiedzi immunologiczną u kur” oraz UMO-2013/11/B/NZ9/00783 pt. „Szlak sygnalizacji TLR aktywowany synbiotykiem miarą poprawy parametrów odporności u kurecząt”.

Komórki nieadherentne, rosnące w zawieszynie, rozdzielane są do nowych naczyń hodowlanych zawierających świeże podłoże (30). Komórki ssaków mają ograniczoną zdolność do mnożenia się w hodowli *in vitro*. Aby opóźnić procesy starzenia, a także przystosować komórki do długotrwałych hodowli, stosuje się modyfikacje komórek z wykorzystaniem genów wirusowych. Tym samym pozyskuje się linie komórkowe, które odznaczają się stałą proliferacją identycznych komórek. Produkty genów wirusowych blokują białka, takie jak p53 czy Rb, hamujące cykl komórkowy, przez co możliwe są nieskończone podziały komórkowe (30, 36, 49). Odpowiednio zachowaną linię komórkową można uznać za bardzo uproszczony model żywego organizmu w badaniach *in vitro* (43, 49).

W 1907 r. Ross Harrison opublikował krótki artykuł informujący o innowacyjnej technice utrzymywania żywotności komórek poza organizmem żywym. Źródłem powstania idei hodowli komórkowych były obserwacje komórek nerwowych żaby i wzrostu ich liczebności w okresie kilku tygodni (18). Wielu naukowców już we wcześniejszych latach podjęło się hodowli

komórek w warunkach *in vitro*, jednak niepokonaną barierę stanowiły problemy z utrzymaniem sterylności, nawracające zakażenia oraz brak odpowiednich narzędzi hodowlanych. Dopiero wprowadzenie przez Harrisona chirurgicznych technik utrzymania aseptyczności przy pobieraniu materiału i prowadzeniu hodowli stało się przełomowym momentem w historii hodowli *in vitro* (19).

Mimo upływu lat i znacznego rozwoju metod utrzymywania sterylności, wielokrotnie dochodzi do zanieczyszczeń hodowli, co prowadzi do konieczności przerwania badań ze względu na apoptozę komórek. Niewykryte zakażenia mogą również powodować zafałszowanie wyników oraz generowanie nieprawidłowego obrazu eksperymentu.

Rodzaje kontaminacji

Główną przesłanką mogącą świadczyć o zakażeniu jest spadek przeżywalności hodowli komórkowej, czyli liczebności komórek żywych w stosunku do komórek martwych. Często dochodzi również do rozpadu komórek. W zależności od rodzaju kontaminacji, proces infekcji przebiega w różnym tempie oraz z odmiennym skutkiem. Najłatwiejsze do rozpoznania i zwalczania są infekcje widoczne bez użycia mikroskopu, takie jak zakażenie grzybami pleśniowymi. Do wykrycia bakterii czy drożdży, z uwagi na ich niewielki rozmiar, konieczne jest obrazowanie mikroskopowe, które nie zawsze jest skuteczne. Najpewniejszą metodą detekcji kontaminacji są analizy molekularne. Do widocznych objawów zakażenia zaliczyć można zmianę zabarwienia czerwieni fenolowej zawartej w medium hodowlanym z różowej na pomarańczową lub żółtą, na skutek obniżenia pH medium wywołanego metabolicznymi produktami ubocznymi czynnika infekcyjnego. Często dochodzi również do silnego zmętnienia medium (31). Mimo ogólnych symptomów, w przypadku każdego rodzaju kontaminacji można wyróżnić specyficzne objawy oraz odpowiedni sposób detekcji.

Bakterie

Bakterie, ze względu na niewielkie wymagania, wszechobecność i szybkie tempo wzrostu, są jedną z najczęściej spotykanych kontaminacji kultur komórkowych (42). W medium hodowlanym pozbawionym antybiotyku ich obecność zauważalna jest już po kilku godzinach prowadzenia hodowli. W większości przypadków infekcji możliwa jest jej detekcja na drodze obserwacji mikroskopowej. Do widocznych objawów takiego zakażenia zaliczyć można: zmianę pH hodowli, zmętnienie i ostatecznie apoptozę komórek (5). Często podczas prowadzenia hodowli komórkowej do medium rutynowo dodawane są antybiotyki, które najczęściej skutecznie eliminują niewielkie ilości bakterii, zanim dojdzie do ich znacznego namnożenia. Szczepy bakterii opornych na dany antybiotyk mogą jednak wykazywać powolny wzrost i powodować

początkowo niski poziom infekcji, przez co zakażenie jest niezauważalne, a detekcja bakterii utrudniona (42).

W laboratorium Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UTP szeroko wykorzystywana w badaniach *in vitro* jest komercyjna linia komórkowa limfocytów B (linia DT40) kurcząt zakażanych ptasim wirusem białaczki (48). Z użyciem tej linii komórkowej prowadzono stymulację *in vitro* ligandami receptorów TLR (Toll Like Receptors) w celu określenia molekularnego mechanizmu odpowiedzi immunologicznej na antygeny LTA (kwas lipotejchowy), LPS (lipopolisacharyd) i KLH (keyhole limpet hemocyanin) (14). Kolejne analizy z wykorzystaniem linii komórkowej DT40 miały na celu wykazanie zastosowania synbiotyków (prebiotyk i probiotyk) do regulacji ekspresji genów kurzego układu immunologicznego poprzez eksperymentalną stymulację DT40 kombinacjami prebiotyków (RFO, inulina oraz Bi2tos) oraz probiotyków (bakterie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) (44, 45).

W trakcie prowadzenia jednego z doświadczeń w hodowli komórkowej wykryto obecność bakterii powodującej początkowo silną proliferację komórek, a następnie drastyczny spadek przeżywalności, prowadzący do ich zamierania. Podczas obserwacji mikroskopowej zauważono niewielkie, ruchome punkty o czarnym zabarwieniu. W zawiesinie komórkowej zaobserwowano silne zmętnienie oraz wahania pH medium uwidocznione poprzez zmianę koloru. Do zauważalnych zmian dochodziło po kilkunastu dniach od założenia hodowli, utrzymywanej w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. Analiza mikrobiologiczna wykazała obecność bakterii *Achromobacter xylosoxidans*, które charakteryzowały się opornością na mieszanie antybiotyków penicyliny i streptomycyny, profilaktycznie dodawanej do medium RPMI w trakcie hodowli. Obecność bakterii w medium hodowlanym istotnie zafałszowywała wyniki analizy ekspresji genów cytokin. W analizie ekspresji genów, wykonanej przy pomocy reakcji RT-qPCR i metody ddCt, wykazane zostało silne podwyższenie poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (IL-8, IL6, IFN- γ , IFN- β) oraz cytokiny przeciwzapalnej IL-4. *Achromobacter* jest Gram-ujemną bakterią o kształcie pręcików, występującą głównie w wodzie i wilgotnej glebie. Optymalna temperatura jej rozwoju wynosi 37-42°C przy pH 6,5-8,5 (17, 25). Dobrze rozwija się również w temperaturze pokojowej. Gray i wsp. (17) wykazali, że skuteczne wyeliminowanie bakterii z hodowli możliwe jest poprzez zastosowanie kombinacji dwóch antybiotyków – piperacyliny i cyprofloksacyny o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ każdy. Z dużą ostrożnością należy wprowadzać do hodowli komórkowej wszelkie antybiotyki. W przypadku zastosowania innych antybiotyków niż ustalone w składzie medium hodowlanego powinny zostać wykonane testy kontrolne, by wykluczyć ich toksyczne działanie.

Poważny problem w hodowlach komórkowych stanowią wolno rosnące bakterie o niewielkich rozmiarach oraz bakterie wewnątrzkomórkowe (42), jak na przykład *Brucella abortus* (12, 20) czy też *Chlamydia trachomatis* (6, 28). Zanieczyszczenie linii komórkowej przez wewnątrzkomórkowe bakterie może utrzymywać się w stanie utajonym w nieskończoność, powodując subtelne i słabo zauważalne zmiany w zachowaniu komórek, które mogą znacznie rzutować na uzyskane w późniejszym czasie rezultaty badań (42).

Grzyby pleśniowe i drożdże

Kontaminacje pochodzenia grzybowego występują równie często, jak bakteryjnego, co wynika z powszechności tych organizmów, ich zdolności adaptacyjnych oraz dużej tolerancji na warunki otoczenia. Ze względu na sposób ich wzrostu i rozmiar, obecność zakażeń grzybowych jest stosunkowo prosta do wykrycia w hodowli. Drożdże zazwyczaj porastają medium hodowlane, przez co staje się ono mętne, z widocznymi kłaczkami w zawieszynie. W obrazie mikroskopowym można zaobserwować okrągłe komórki drożdży (42). Grzyby pleśniowe rozrastają się w podłożu w postaci strzępek, a dalszy rozrost grzybni daje się zauważyć w postaci puchatych kępek. Grzyby, ze względu na wysoką tolerancję, bardzo dobrze przeżywają w każdym środowisku, a warunki panujące w inkubatorze (37°C, wysoka wilgotność, 5% CO₂) oraz skład medium hodowlanego (dodatek glukozy) są optymalne do ich rozwoju (16, 37).

Mykoplazmy

Wśród zanieczyszczeń hodowli *in vitro* czynnikami biologicznymi mykoplazmy stanowią poważny problem z powodu niskiego współczynnika wykrywalności oraz znaczącego wpływu na komórki zwierzęce (5). Wzrost mykoplazm może następować w ścisłej współpracy ze wzrostem komórek ssaczy, często w sposób utajony przez długi czas (40). Infekcja mykoplazmą postępuje stosunkowo wolno, w porównaniu do zakażenia bakteriami czy też drożdżami (31). Wzrost mykoplazmy nie powoduje widocznego zmętnienia medium, które jest powszechnie związane z zakażeniem przez bakterie (40). Mykoplazma to zwyczajowa nazwa prokariotycznej klasy mikroorganizmów *Mollicutes* (26). Pierwszy raz zidentyfikowana i opisana została w 1956 r. przez Robinsona, który po odkryciu zanieczyszczenia komórek HeLa próbował zbadać wpływ obecności mykoplazm na prowadzoną hodowlę komórkową (39). Mykoplazmy są prostymi bakteriami, które posiadają wyjątkowe cechy, zdecydowanie odróżniające je od innych przedstawicieli grupy organizmów prokariotycznych. Są znacznie mniejsze od większości bakterii, co umożliwia przedostawanie się ich przez membrany filtracyjne oraz wzrost w zawieszinach komórkowych o bardzo dużej gęstości, bez widocznych oznak infekcji. Mykoplazmy

są najmniejszymi znanymi, samoreplikującymi się organizmami, pozbawionymi ściany komórkowej (5, 26, 31). Większość stosowanych w mediach hodowlanych antybiotyków uszkadza bakteryjną ścianę komórkową, stąd też mykoplazmy są całkowicie odporne na ich działanie (5), infekcja ta nie skutkuje jednak natychmiastowym ani bezpośrednim zniszczeniem hodowli (31). Mimo że mykoplazmy nie powodują zmętnienia medium ani zmiany pH, znacznie wpływają na komórki gospodarza, oddziałując na ich metabolizm oraz morfologię, wywołując aberracje chromosomowe i uszkadzając komórki (5, 26, 42). Z tego powodu zakażenia mykoplazmami mogą mieć istotny wpływ na wzrost i funkcjonowanie komórek, syntezę i wydzielanie metabolitów w komórce oraz ekspresję genów. Dodatkowo może dojść do uszkodzenia membrany komórkowej, kwasów nukleinowych czy organelli wewnątrzkomórkowych, zmian w poziomie białka oraz w składzie błon komórkowych (13, 21). Długotrwałe zakażenie komórek mykoplazmami o pozornie niskiej zjadliwości może stopniowo wywoływać niestabilność chromosomową oraz transformacje nowotworowe, związane ze zwiększeniem lub zmniejszeniem poziomu ekspresji wielu genów (40, 47). Obecność mykoplazm w medium może zakłócać aktywację limfocytów, indukować lub tłumić ekspresję cytokin oraz wpływać na transdukcję sygnałów (13). Wpływa ona również na różnicowanie i aktywację komórek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (makrofagów, komórek dendrytycznych, neutrofilii i komórek NK – Natural Killers) oraz odpowiedzi nabytej (limfocyty B i T) (40). Zmiany te skutkują znacznym zafałszowaniem ostatecznych wyników doświadczeń prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowych. Do infekcji hodowli komórkowej może dojść między innymi przez wprowadzenie do pożywki zakażonej surowicy bydłowej, powszechnie stosowanej w kulturach *in vitro* (2).

Endotoksyny

Endotoksyny to produkty bakterii Gram-ujemnych, zawierające lipopolisacharyd (LPS), będący głównym komponentem bakteryjnej błony komórkowej (5, 41). Te cząsteczki o wysokiej aktywności biologicznej występują powszechnie w wodzie, surowicach stosowanych do hodowli czy też innych składnikach dodawanych do medium (5). Bakterie w czasie wzrostu uwalniają niewielkie ilości endotoksyn do środowiska, natomiast znaczne ilości endotoksyn zostają uwolnione w momencie ich śmierci (41). W 1984 r. opublikowano po raz pierwszy doniesienie o skutkach obecności endotoksyn w hodowli komórkowej. Już przy niskim poziomie endotoksyn zaobserwowano pobudzenie hodowli leukocytów do produkcji czynników tkankowych, aktywację mysich makrofagów oraz zahamowanie powstawania mysich kolonii erytoidalnych (9, 41). Obecność endotoksyn wywiera ogromny wpływ na

komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną (5). Zdolność wrodzonego układu odpornościowego do zainicjowania reakcji na endotoksyny spowodowana jest obecnością dwóch białek: białka wiążącego LPS (LPS Binding Protein – LBP) i CD14 (46). Rzeczywistą rolę LBP jest uwrażliwianie komórek na obecność LPS (32). Natomiast funkcja receptora błonowego CD14 jest silnie powiązana z wrażliwością na endotoksyny i stanowi niezmiernie istotny element w czasie prowadzenia hodowli zawierających surowicę w składzie medium. Jej składniki, takie jak LBP czy kompleks septyny, mogą nasilać aktywację komórek posiadających receptor CD14. Niektóre hodowle komórkowe ssaków i bezkręgowców wykazują tolerancję na endotoksyny (11), jednak znacząca część badań w układzie *in vitro* wykazała, że obecność endotoksyn wywiera negatywny wpływ na wzrost i wydajność kultur komórkowych oraz zaburza przebieg i wyniki eksperymentów (5).

Wirusy

Infekcje wirusowe mogą wykazywać znacznie wyższą patogeniczność niż bakteryjne, a ich identyfikacja jest trudna i kosztowna. Obecność wirusa nie skutkuje widocznymi zmianami w hodowli komórkowej, takimi jak zmiana pH medium hodowlanego oraz jego zmętnienie (5). Niewielki rozmiar wirusów nie pozwala na obserwację w świetle widzialnym mikroskopu. Do ujawnienia obecności wirusów w hodowlach *in vitro* dochodzi dopiero w momencie, gdy zachodzą zmiany morfologiczne komórek, wywołane efektem cytopatycznym (33). Wirusy wykorzystują gospodarza do replikacji, przez co leki stosowane do blokowania ich namnażania mogą wykazywać toksyczny efekt na hodowane komórki (5), jednak wirusy wykazują restrykcyjne wymagania w odniesieniu do typu komórek gospodarza, przez co nie atakują nieodpowiednich dla nich hodowli komórkowych. W momencie infekcji wirusy przejmują kontrolę nad komórką, prowadząc do jej destrukcji (42). W niektórych przypadkach może dojść do zakażenia w postaci prowirusa, tak jak podczas infekcji wirusem ospy krowiej (AAV), który nie może replikować bez obecności wirusa pomocniczego. Do replikacji dochodzi dopiero w momencie, gdy oba dostępne są razem (33). Ponadto, obecność wirusów w hodowlach komórkowych może stanowić ogromne zagrożenie dla personelu laboratoryjnego.

Pierwotniaki

W standardowych hodowlach komórkowych pierwotniaki występują rzadko, ale do zakażeń może dochodzić przy pracy z tkankami zwierzęcymi, takimi jak nerki lub jelito grube (38). Najczęstszym czynnikiem infekcyjnym w tym przypadku są ameby, zazwyczaj pochodzenia glebowego, łatwo izolowane z powietrza i tkanek. Ze względu na powolny wzrost morfologiczny oraz częste podobieństwo do hodowa-

nych komórek, wykrycie i identyfikacja pierwotniaków są utrudnione podczas standardowej kontroli mikroskopowej (42). Powszechnie izolowane z zarażonych hodowli są ameby *Hartmannella limax* (38). Ich wystąpienie może powodować efekty cytopatyczne, które przypominają uszkodzenie wirusowe i prowadzą do zniszczenia kultur w ciągu dziesięciu dni (42). Wśród najpowszechniejszych pierwotniaków zakażających hodowle komórkowe znajdują się gatunki z rodzajów: *Giardia*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Leishmania* i *Trypanosoma* (38). Po raz pierwszy nieindukowane zakażenie pierwotniakami opisane zostało na przykładzie małych komórek nerkowych przez wolno żyjące ameby (23). Zidentyfikowane zostało również w hodowli psich komórek chłoniaka, HeLa, a także fibroblastów zarodków ptasich (22, 38).

Bezkręgowce

Powszechnie spotykane zagrożenie stanowią owady i pajęczaki, w szczególności muchy, karaczany, mrówki i roztocza. Same w sobie nie są groźnymi czynnikami zanieczyszczającymi hodowle *in vitro*, jednak będąc wektorem dla zanieczyszczeń mikrobiologicznych, stanowią duże zagrożenie (42). Ich obecność wynika głównie z zaniedbań w praktyce laboratoryjnej, jednak ograniczone możliwości rozwojowe w środowisku hodowlanym niwelują problem kontaminacyjny.

Kontaminacje krzyżowe

Kontaminacje krzyżowe stanowią zanieczyszczenia danej linii komórkowych przez niepowiązane z nią komórki innej linii i należą do jednych z najtrudniejszych w detekcji (5, 29). Taka infekcja może przejść niezauważona, szczególnie gdy komórki zanieczyszczające zarastają i zastępują utrzymywaną uprzednio hodowlę. Linia zakażająca może całkowicie zdominować hodowlę, powodując utratę oryginalnej linii komórek, a tym samym wywierać istotny wpływ na wyniki badań (5, 29, 31). W przypadku znacznego podobieństwa morfologicznego obu typów komórek, procedura kontrolna obejmująca obserwację mikroskopową może być zawodna w określeniu zmian morfologicznych, często niezauważalnych nawet podczas obserwacji komórek pod mikroskopem odwróconym (29). W tej sytuacji wiarygodne wyniki mogą dać jedynie takie metody, jak kariotypowanie, analiza izoenzymatyczna czy DNA Barcoding, pozwalające określić fenotyp i gatunek pochodzenia danej populacji komórek (5, 7, 31). W 1967 r. analizy izoenzymatyczne wykazały zanieczyszczenie 20 powszechnie stosowanych ludzkich linii komórkowych przez komórki HeLa. Jest to linia komórkowa, która wywodzi się z komórek raka szyjki macicy. Komórki HeLa są niezwykle agresywne oraz nieśmiertelne, a przypadkowo wprowadzone do hodowli, szybko przejmują funkcję oryginalnej linii komórkowej (5, 34, 35). Rozpowszechniający się problem kontaminacji krzyżowych związany jest

z brakiem identyfikacji tożsamości nowo pozyskanych linii komórkowych w laboratoriach. W identyfikacji wewnątrzgatunkowej komórek ludzkich standardem stało się profilowanie STR (krótkie powtórzenia tandemowe) (7). Kwestia kontaminacji krzyżowych dotyczy głównie ludzkich linii komórkowych. Większość zanieczyszczeń powstaje w obrębie tego samego gatunku, rzadziej dochodzi do zanieczyszczeń międzygatunkowych (8).

Detekcja kontaminacji w hodowlach komórkowych

Identyfikacja bakterii, drożdży i grzybów w dużej mierze oparta jest na testach mikrobiologicznych i mikroskopowej obserwacji hodowli. W przypadku, gdy obrazowanie mikroskopowe nie jest możliwe lub rodzaj kontaminacji hodowli komórkowych jest trudny do identyfikacji, istnieje możliwość zastosowania metod biochemicznych czy molekularnych.

Do wykrycia zanieczyszczeń wirusowych można zastosować panel przeciwciał do barwienia immunologicznego lub testu ELISA. Alternatywnie wykorzystana może zostać również łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) z odpowiednimi starterami (15). Do wykrywania i oznaczania ilościowego endotoksyn szeroko stosowany jest test LAL (Limulus Amebocyte Lysate), oparty na enzymach wytwarzanych w czerwonych krwinkach przez skrzypłocza (*Limulus*), które wiążą i dezaktywują endotoksyny bakteryjne (41). W celu identyfikacji mykoplazm przydatna jest metoda swoistego barwienia mykoplazmatycznego DNA barwnikami fluorescencyjnymi, która umożliwia obrazowanie mykoplazmy pod mikroskopem fluorescencyjnym jako jasne punkty w cytoplazmie. Z pozostałych metod detekcji mykoplazm najbardziej powszechne są: reakcja PCR, autoradiografia, ELISA, immunofluorescencja oraz specyficzne testy biochemiczne (31, 42).

Eliminacja źródeł zakażenia hodowli komórkowych

Za większość zanieczyszczeń hodowli komórkowych odpowiedzialne są błędy w praktyce laboratoryjnej. Niewłaściwe warunki w laboratoriach hodowli komórkowych oraz nieprzestrzeganie zasad pracy z kulturami *in vitro* może skutkować wprowadzeniem czynnika infekcyjnego. Procedury laboratoryjne powinny odbywać się według zasad Dobrej Praktyki Laboratoryjnej w Hodowli Komórek (GCCP – Good Cell Culture Practice) (10). W celu uniknięcia zakażeń konieczna jest każdorazowa dezynfekcja 70% alkoholem powierzchni roboczych, narzędzi oraz stosowanych naczyń i pojemników z odczynnikami. Wszelkie prace przy hodowlach komórkowych powinny odbywać się w czystym, wcześniej wysterylizowanym promieniowaniem UV, pomieszczeniu, pod komorą z laminarnym przepływem sterylnego powietrza. Konieczne jest również odpowiednie zabezpieczenie pracownika laboratorium w odzież ochronną (5, 15).

Media, surowice, odczynniki oraz naczynia hodowlane mogą również stanowić źródło ewentualnej kontaminacji, dlatego wskazane jest używanie jednorazowych, sterylnych naczyń oraz narzędzi. Przygotowywane medium hodowlane powinno być poddane filtracji, całkowicie eliminującej możliwość przedostania się bakterii czy grzybów. Hodowla komórkowa i media powinny być otwierane tylko w sterylnie czystej komorze (3, 15).

W redukcji zagrożenia kontaminacją, ważną rolę odgrywa również inkubator CO₂. Jego główną funkcją jest zapewnienie idealnych warunków do prawidłowego rozwoju komórek i utrzymywanie ich przy życiu w hodowli ciągłej. Optymalna temperatura w inkubatorze dla większości linii komórkowych wynosi 37°C, natomiast pH medium hodowlanego powinno zawierać się w przedziale wynoszącym od 7,4 do 7,6. Konieczny jest również zrównoważony poziom CO₂, przy wilgotności względnej w granicach 95%. Tym samym idealne środowisko dla komórek zwierzęcych stanowi również optymalne środowisko do rozwoju zagrażających im czynników infekcyjnych (16). Z tego względu inkubator należy regularnie poddawać procesom dezynfekcji przy pomocy detergentów, 70% alkoholu etylowego, promieniowania UV, gorącej pary wodnej lub oparów nadtlenu wodoru. Jej nieprawidłowe wykonanie skutkować może nawrotami zanieczyszczeń hodowli (3, 4).

Źródłem zakażenia mogą być również linie komórkowe lub próbki tkanek wprowadzane do laboratorium. W celu uniknięcia infekcji, hodowla powinna zostać poddana kwarantannie do momentu wykazania jej sterylności. Wskazane jest nabywanie linii komórkowych za pośrednictwem renomowanych banków kultur komórkowych, gdzie rutynowo prowadzona jest kontrola czystości (15). W przypadku, gdy komórki poddawane są utrwalaniu, konieczna jest weryfikacja ich czystości biologicznej, ze względu na możliwość przeniesienia zanieczyszczeń, takich jak bakterie i ich formy przetrwalne.

Wskazaniem sposobem eliminowania zanieczyszczeń w hodowlach *in vitro* jest likwidacja kultur, medium oraz odczynników, które miały kontakt z zakażonymi komórkami. Próby zachowania hodowli skutkować mogą rozprzestrzenieniem się czynnika infekcyjnego oraz powodować rozwój mikroorganizmów odpornych na antybiotyki (15). Do walki z mykoplazmami zastosować można antybiotyki z klasy makrolitów, fluorochinolony i tetracykliny, o ile nie działają toksycznie na hodowle komórkowe (13, 15). Dobranie odpowiedniego antybiotyku przeciw bakteriom jest utrudnione ze względu na mnogość szczepów i wytworzoną oporność na liczne grupy antybiotyków. W przypadku wirusów nie ma wiarygodnych metod ich eliminacji z hodowli.

Podsumowując, zakażenie hodowli może wynikać zarówno z zanieczyszczeń chemicznych, wywołanych przez stosowane media, surowice oraz pozostałe skład-

niki stosowane w hodowlach *in vitro*, jak i przez wyżej opisane zanieczyszczenia biologiczne lub kontaminacje krzyżowe niezależnych linii. Mimo braku możliwości całkowitej eliminacji ryzyka infekcji, konieczne jest zrozumienie zasad sterylnej pracy z hodowlami komórkowymi oraz poznanie źródeł zakażenia i objawów świadczących o ewentualnej kontaminacji, by skutecznie niwelować istniejące zagrożenie.

Piśmiennictwo

1. Artursson P.: Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture: A model for Studying the Passive Diffusion of Drugs over Intestinal Absorbative (Caco-2) Cells. *J. Pharm. Sci.* 1990, 79, 476-482.
2. Barile M. F., Kern J.: Isolation of Mycoplasma arginini from commercial bovine sera and its implication in contaminated cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1971, 138, 432-437.
3. Bates M. K., Wernerspach D.: Cell Culture Contamination – part 2. *Lab. Manager Mag.* 2011, 5, 1-4.
4. Bates M. K., Wernerspach D.: Cell Culture Contamination – part 3. *Lab. Manager Mag.* 2011, 6, 1-4.
5. Bates M. K., Wernerspach D.: Cell Culture Contamination – understanding the causes and managing the risks. *Lab. Manager Mag.* 2011, 4, 1-4.
6. Beatty W. L., Morrison R. P., Byrne G. I.: Reactivation of Persistent Chlamydia trachomatis Infection in Cell Culture. *Infect. Immun.* 1995, 63, 199-205.
7. Burnett E., Cooper J.: Detection and Prevention of Cell Line Cross-Contamination. *Biowire Spring* 2012, 19-21.
8. Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., Drexler H. G., Kohara A., MacLeod R. A. F., Masters J. R., Nakamura Y., Reid Y. A., Reddel R. R., Freshney R. I.: Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int. J. Cancer* 2010, 127, 1-8.
9. Case Gould M. J.: Endotoxin in Vertebrate Cell Culture: Its Measurement and Significance. In *Uses and Standardization of Vertebrate Cell Lines*. Tissue Culture Association 1984, 125-136.
10. Červinka M.: Dobra praktyka laboratoryjna, [w:] Stokłosowa S. (red.): *Hodowla komórek i tkanek*. PWN, Warszawa 2006, s. 36-44.
11. Dawson M. E.: The Significance of Endotoxin to Cell Culture and Biotechnology. *LAL Update* 1998, 1, 1-4.
12. Detilleux P. G., Deyoe B. L., Cheville N. F.: Penetration and Intracellular Growth of Brucella abortus in Nonphagocytic Cells In Vitro. *Infect. Immun.* 1990, 58, 2320-2328.
13. Drexler H. G., Uphoff C. C.: Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002, 39, 75-90.
14. Dunisławska A., Sławińska A., Siwek M.: Expression of the immune-related genes in chicken B lymphocytes stimulated in vitro with KLH, LTA and LPS antigens. The 2nd International Scientific Conference „Animal Biotechnology”, Słowacja, Nitra. *Slovak J. Anim. Sci.* 2014, 47, 209-210.
15. Freshney R. I.: Contamination, [w:] Freshney R. I. (ed.): *Culture of Animal Cells*. Wiley-Blackwell, New Jersey 2007, s. 299-315.
16. Gock M. A., Hocking A. D., Pitt J. I., Poulos P. G.: Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 81, 11-19.
17. Gray J. S., Birmingham J. M., Fenton J. I.: Got black swimming dots in your cell culture? Identification of Achromobacter as a novel cell culture contaminant. *Biologicals* 2010, 38, 2, 273-277.
18. Harrison R.: Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1907, 1, 116-128.
19. Harrison R.: The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 1910, 9, 787-846.
20. Hatten B. A., Huang S. Y., Schulze M. L., Sulkin E.: Electron Microscopy of Tissue Culture Cells Infected with Brucella abortus. *J. Bacteriol.* 1971, 108, 535-544.
21. Held P.: Dangers of Mycoplasma in cell-based assays. *Lab. Manager Mag.* 2007, 5, 25-28.
22. Holmgren N. B.: Contamination in tissue culture by parasites, [w:] Fogh J. (red.): *Contamination in Tissue Culture*. Academic Press, New York 1973, s. 195-203.
23. Jahnke W. G., Fullmer H. M., Li C. P.: Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, 96, 484-488.
24. Kasperczyk K., Bajek A., Joachimiak R., Walasik K., Marszałek A., Drewa T., Bednarczyk M.: In vitro optimization of the Gallus domesticus oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology* 2012, 77, 1834-1845.
25. Kim M. J., Bancroft E., Lehnkering E., Donlan R. M., Mascola L.: Alcaligenes xylooxidans Bloodstream Infections in Outpatient Oncology Office. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 7, 1046-1052.
26. Kumar A., Egli S., Martin J., Golightly C., Kuriyel R.: Contamination Costs. *European Biopharmaceutical Review* 2009, s. 68-74.
27. Lu Y., Jiang S., Zhang J., Song H., Li L.: Estradiol activates MAPK signaling pathway by estrogen induced VEGF and bFGF in endometrial cancer cells. *Chinese J. Obstet. Gynecol.* 2014, 49, 925-931.
28. Lucero M. E., Kuo C. C.: Neutralization of Chlamydia trachomatis Cell Culture Infection by Serovar-Specific Monoclonal Antibodies. *Infect. Immun.* 1985, 50, 595-597.
29. Markovic O., Markovic N.: Cell cross-contamination in cell culture: The silent and neglected danger. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal* 1998, 34, 1-8.
30. Masters J. R. W.: Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2000, 1, 233-236.
31. Mather J. P., Roberts P. E.: Contamination: How to Avoid It, Recognize It, and Get Rid of It, [w:] *Introduction to Cell and Tissue Culture – Theory and Technique*. Plenum Press, New York and London 2002, s. 117-127.
32. Mathison J. C., Tobias P. S., Wolfson E., Ulevitch R. J.: Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: A key component in macrophage recognition of Gram-negative LPS. *J. Immunol.* 1992, 149, 200-206.
33. Merten O. W.: Virus contaminations of cell cultures – A biotechnological view. *Cytotechnology* 2002, 39, 91-116.
34. Nardone R. M.: Curbing rampant cross-contamination and misidentification of cell lines. *Biotechniques* 2008, 3, 221-227.
35. Nelson-Rees W. A., Daniels D. W., Flandermeyer R. R.: Cross-Contamination of Cells in Culture. *Science* 1981, 4493, 446-452.
36. Palut D., Kostka D., Adamczyk M.: Molecular mechanisms of chemically induced carcinogenesis. *Roczn. PZH* 1998, 49, 35-54.
37. Reischke S., Rousk J., Baath E.: The effects of glucose loading rates on bacterial and fungal growth in soil. *Soil Biol. Biochem.* 2014, 70, 88-95.
38. Robert J. H., Ikonomi P.: Detection of Microbial and Viral Contaminants in Cell Lines, [w:] Celis J. E. (red.): *Cell Biology*. Elsevier Science, Philadelphia 2006, Vol. 1, Section 1, s. 49-66.
39. Robinson L., Wichelhausen R. H.: Contamination of human cell cultures by pleuropneumoniae organisms. *Science* 1956, 124, 1147-1148.
40. Rottem S., Kosover N. S., Kornspan J. D.: Contamination of Tissue Cultures by Mycoplasmas, [w:] Ceccherini-Nelli L., Matteoli B. (red.): *Biomedical Tissue Culture*. Intech 2012, s. 35-58.
41. Ryan J.: Endotoxins and Cell Culture. *Corning Incorporated, Technical Bulletin* 2008b, s. 1-8.
42. Ryan J.: Understanding and Managing Cell Culture Contamination. *Corning Incorporated, Technical Manual* 2008, s. 1-22.
43. Ryan J. A.: Introduction to Animal Cell Culture. *Corning Incorporated, Technical Bulletin* 2008a, s. 1-8.
44. Sławińska A., Siwek M., Bednarczyk M.: In vitro screening of immunomodulatory properties of the synbiotics in chicken DT40 cell line. *Anim. Sci. Pap. Rep.* (in press).
45. Sławińska A., Siwek M., Plowiec A., Dunisławska A., Bednarczyk M., Bluyssen H.: Synbiotics-Regulated Gene Expression Signatures Determined in Vitro reflect the Molecular Background of the Treated Host Animal. *XXIII International Plant&Animal Genome*, January 10-14.01.2015, San Diego, CA, USA.
46. Tobias P. S., Mathison J. C., Ulevitch R. J., Tapping R. I., Orr S.: Endotoxin Activation of Cells by LPS Binding Protein and CD14 The Innate Immune System at Work. *Dorothy R. Havemeyer Foundation Neonatal Septicemia Workshop. Workshop II*, Boston MA, 1998 [online 29.01.2015]
47. Tsai S., Wear D. J., Shihit J. W. K., Lo S. C.: Mycoplasma and oncogenesis persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 10197-10201.
48. Winding P., Berchold M. W.: The chicken B cell Line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J. Immunol. Methods* 2001, 249, 1-16.
49. Wójtowicz A.: Linie komórkowe, [w:] Stokłosowa S. (red.): *Hodowla komórek i tkanek*. PWN, Warszawa 2006, s. 140-156.

Adres autora: mgr inż. Aleksandra Dunisławska, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: aleksandra.dunisławska@utp.edu.pl