baria

PŘÍRUČKA K ZVLÁDÁNÍ A PRONIKNUTÍ DO PROBLEMATIKY **KONTAMINACE BUNĚČNÝCH KULTUR**

CORNING

ÚVOD

Žádný problém spojený s buněčnými kulturami není tak všeobecně rozšířený jako ztráta kultury v důsledku kontaminace. Všichni pracovníci a všechny laboratoře pracující s buněčnými kulturami tuto zkušenost mají. Kontaminace kultury může být biologická nebo chemická, viditelná nebo neviditelná, destruktivní nebo vypadající neškodně. Ve všech případech však nepříznivě ovlivňuje jak použití vaší buněčné kultury, tak kvalitu výzkumu. Problémy kontaminace mohou být rozděleny do tří skupin:

- **drobná trápení** - čas od času je kontaminováno několik destiček nebo lahví;

- **vážné problémy** - četnost kontaminací se zvyšuje nebo dochází ke ztrátě celých experimentů nebo buněčných kultur;

- **úplná katastrofa** - objevené kontaminace (obvykle jiná buněčná linie nebo mykoplazma) snižují věrohodnost dřívějších nebo současných výsledků.

Nejočividnější následek kontaminace buněčné kultury je ztráta vašeho času, peněz (za buňky, kultivační nádoby, média a séra) a energie vynaložené na udržování kultur a přípravu experimentů. Nicméně, právě ty méně zřejmé následky jsou často vážnější (Tab. 1). Předně jsou zde nepříznivé následky na kultury trpící neodhalenou chemickou nebo biologickou kontaminací. Tyto skryté kontaminanty mohou dosáhnout vysokých koncentrací a ovlivnit růstové a jiné vlastnosti kultur. Horší jsou pak potenciálně nepřesné či chybné výsledky získané nevědomou prací s takto skrytě kontaminovanými kulturami.

Produkty vyráběné pomocí těchto kultur, jako jsou vakcíny, léčiva nebo monoklonální protilátky, budou pravděpodobně nepoužitelné. Nejzávažnějším následkem kontaminace je pak pro některé vědce a výzkumníky ztrapnění se a poškození jejich reputace, pokud oznámí spolupracovníkům nebo časopisům, že jejich experimentální výsledky jsou chybné v důsledku kontaminace buněčných kultur a musí být tedy staženy.

Prevence kontaminace buněčných kultur je již dlouho snem mnoha vědců, pro většinu je to však sen velmi obtížný, ne-li neuskutečnitelný. **Kontaminace nemůže být úplně eliminována, může však být řízeně snížena jak frekvence výskytu, tak závažnost následků.** Cílem této práce je ukázat původ kontaminace buněčných kultur a problémy, které způsobuje, a představit některé klíčové koncepty a praktické strategie kontroly kontaminací vedoucí k prevenci ztráty cenných kultur a experimentů.

Některé následky kontaminace:

- ztráta času, peněz a energie
- nepříznivé dopady na kulturu
- ztráta hodnotných produktů
- osobní dopady
- nepřesné nebo chybné experimentální výsledky

ČÁST 1: Jaké jsou hlavní kontaminanty buněčných kultur?

Kontaminanty buněčných kultur mohou být definovány jako součást kultivačního systému, která je nechtěná z důvodu možných nežádoucích vlivů na systém nebo jeho použití. Tyto součásti mohou být rozděleny do dvou hlavních kategorií: chemické kontaminanty a biologické kontaminanty.

Chemické kontaminanty

Chemická kontaminace jde nejlépe popsat jako přítomnost nějaké neživé substance, která má nežádoucí vliv na kultivační systém. Detailnější definice je však obtížná; i základní živiny mohou být v dostatečně vysokých koncentracích toxické. Toxicita navíc není jediným problémem. Hormony a další růstové faktory přítomné v séru mohou totiž způsobit změny, které sice nejsou nutně škodlivé pro kulturu, ale jsou nechtěné výzkumníky pracujícími s daným systémem. [zhodnocení v 1, 2]

MÉDIA

Většina chemických kontaminant se nachází v kultivačním médiu a pochází buď z reagencií a vody použité k jejich přípravě, nebo z doplňkových látek, např. séra. Reagencie by vždy měly být té nejvyšší kvality a čistoty a musí být náležitě skladovány, aby nedošlo k jejich degradaci. Ideálně by měly být certifikovány pro použití v buněčných kulturách buď výrobcem, nebo před použitím vědecky zhodnoceny. Chyby v protokolech k přípravě médií, při čtení popisků na lahvích s reagenciemi nebo při vážení chemikálií jsou dalšími běžnými zdroji chemické kontaminace. [3]

Typy a zdroje potenciální chemické kontaminace:

- kovové ionty, endotoxiny a další nečistoty v médiu, séru a vodě
- změkčovadla v laboratorním plastu a zásobních lahvích
- volné radikály produkované v médiu fotoaktivací tryptofanu, riboflavinu nebo HEPES po expozici fluorescenčnímu záření
- nečistoty v plynech užívaných v CO_2 inkubátorech
- rezidua germicidů nebo pesticidů použitých k dezinfekci inkubátorů, vybavení a laboratoře
- usazeniny ve skleněných nádobách, pipetách, nástrojích, atd., zbytky dezinfekčních prostředků a detergentů, složky změkčovadel ve vodě z autoklávu, rezidua z hliníkové fólie nebo papíru

SÉRA

Séra přidávaná do médií jsou již dlouhou dobu zdrojem jak chemické, tak biologické kontaminace. Díky screeningovým programům buněčné kultivace v současnosti používaným dobrými výrobci sér je neobvyklé nalézt šarži fetálního hovězího séra, která by byla toxická pro většinu buněčných kultur. Na druhou stranu je u různých šarží séra běžné nalézt výrazné rozdíly v podpoře růstu pro konkrétní buněčné systémy, především pro kultury se speciálními nebo odlišnými vlastnostmi. Neregulovatelné rozdíly mezi šaržemi co do koncentrace hormonů a růstových faktorů dělají tento problém nevyhnutelným; řešením může být pečlivé testování sér před použitím nebo přechod na bezsérová média.

Také nezapomeňte na to, že sérové proteiny v médiu mají schopnost vázat podstatné množství chemických kontaminantů, především těžkých kovů, které mohou do kultivačního systému vstupovat z jiných zdrojů, a tím je učinit méně dostupné buňkám, čímž sníží jejich toxicitu. Ve výsledku může přechod od médií se sérem na bezsérová média demaskovat tyto toxické chemické kontaminanty a vystavit tak buňky jejich nepříznivému účinku.

VODA

Voda používaná pro přípravu médií a mytí skleněného vybavení je častým zdrojem chemické kontaminace a vyžaduje speciální pozornost pro zajištění její kvality. Tradičně byla doporučována jako nejlepší zdroj vysoce kvalitní vody pro kultivační média a roztoky dvojitá nebo trojitá destilace. Nyní většina purifikačních systémů kombinuje reverzní osmózu, iontoměniče a ultrafiltraci a je schopna odstranit zbytkové kovy, rozpuštěné organické látky a endotoxiny. Nicméně tyto systémy musí být správně udržovány a servisovány pro zajištění stálé kvality vody. Jelikož se chová jako agresivní rozpouštědlo, může vysoce purifikovaná voda vyplavovat potenciálně toxické kovové ionty z laboratorního skla nebo kovových trubek a změkčovadla z plastikových skladovacích sáčků, nádob nebo zkumavek. Tato kontaminace pak může skončit v médiu nebo být uložena ve skladovacích nádobách a pipetách během promývání a omývání. Voda používaná v autoklávech ke generování páry může obsahovat aditiva ke snížení shromažďování vody v trubkách; tato potenciálně toxická aditiva mohou též skončit na laboratorním skle.

ENDOTOXINY

Endotoxiny, součást lipopolysacharidů tvořených gramnegativními bakteriemi, jsou dalším zdrojem chemické kontaminace buněčných kultivačních systémů. Endotoxiny se běžně vyskytují ve vodě, sérech a některých kultivačních aditivech (především těch vyráběných mikrobiální fermentací) a mohou být snadno kvantifikovány pomocí testu s amébocytovým lyzátem z ostrorepa (Limulus Amebocyte Lysate assay -LAL).

Tyto vysoce biologicky reaktivní molekuly mají hlavní vliv in vivo na humorální a buněčné systémy. Práce zaměřené na endotoxiny v in vitro systémech ukázaly, že mohou ovlivnit růst nebo chování kultur a jsou prokazatelným zdrojem variability experimentů.[zhodnocení v 6, 39] Jelikož se buněčnou kultivací získávají některá léčiva, např. hybridomy a vakcíny, které mohou být znehodnoceny velkým množstvím endotoxinu, je třeba udělat vše proto, aby se hladiny endotoxinů v kultivačních systémech držely tak nízko, jak jen je možné.

V minulosti bývaly hlavním zdrojem kontaminace endotoxiny v buněčné kultivaci séra. Zdokonalení detekce endotoxinů (LAL) vedlo ke zvýšení povědomí o potenciálních problémech buněčné kultivace spojené s endotoxiny a většina výrobců značně snížila jejich množství v sérech zpracováním produktů za aseptických podmínek. Špatně udržované vodní systémy, především ty užívající iontoměničové pryskyřice, mohou obsahovat významné množství bakterií produkujících endotoxiny a v případě podezření nebo zjištění problémů v kulturách by měly být zkontrolovány.

SKLADOVACÍ NÁDOBY

Dalším zdrojem kontaminace mohou být média skladovaná ve skleněných nebo plastových lahvích, které předtím obsahovaly roztoky těžkých kovů nebo organické látky, jako jsou barviva na elektronovou mikroskopii, rozpouštědla a pesticidy. Kontaminace může být adsorbována na povrch lahví nebo uzávěrů (nebo absorbována do lahve, je-li z plastu) během skladování původního roztoku. Pokud jsou během promývacího procesu odstraněny pouze částečně, mohou se během kontaktu s kultivačním médiem postupně uvolňovat zpět do roztoku. Zbytky chemikálií použitých k dezinfekci laboratorního skla, detergenty použité během mytí nebo hliníková fólie a balící papíry k autoklávování nebo suché teplotní sterilizaci mohou též zanechávat toxické usazeniny na pipetách, skladovacích lahvích a vybavení.

FLUORESCENČNÍ ZÁŘENÍ

Důležitý, avšak často přehlížený zdroj chemické kontaminace pochází z vystavení média obsahujícího HEPES (4-2(-hydroxyethyl)-1-piperazin ethansulfonová kyselina – organický pufr běžně používaný k doplnění bikarbonátových pufrů), riboflavin nebo tryptofan fluorescenčnímu záření. Tyto složky média mohou být fotoaktivovány a produkovat peroxid vodíku nebo volné radikály, které jsou pro buňky toxické. Čím delší expozice, tím vyšší toxicita.[4] Krátkodobé vystavení média tlumenému osvětlení nebo běžnému osvětlení v místnosti během manipulace s kulturou běžně není zásadním problémem. Ponechání média na pracovní ploše po delší dobu, skladování média v průchozích chladících místnostech se zapnutým osvětlením nebo používání chladniček se skleněnými dveřmi, kde vystavení fluorescenčnímu osvětlení je již značné, však už k postupnému snížení kvality média vést může.

INKUBÁTORY

Zdrojem chemické kontaminace může být také inkubátor, který je též často pokládaný za hlavní zdroj biologické kontaminace. Směs plynů (běžně obsahující oxid uhličitý pomáhající regulovat pH média) procházející skrz několik inkubátorů může obsahovat toxické nečistoty, především oleje a jiné plyny jako oxid uhelnatý, které mohou být předtím použity ve stejném skladovacím tanku nebo tlakové lahvi. Tento problém je velmi ojedinělý u plynů v medicínské čistotě, je však velmi běžný u levnějších směsí plynů v průmyslové jakosti.[5] Pozornost musí být také věnována tomu, aby byla při připojování nových tlakových lahví připojena správná láhev se správným plynem. Dalšími potenciálními chemickými kontaminanty jsou toxická, těkavá rezidua zůstávající po čištění a dezinfekci inkubátorů. Při návratu čerstvě vyčištěného inkubátoru do provozu by neměl být cítit zápach dezinfekčních prostředků.

Mějte na paměti, že chemické kontaminanty mají tendenci se ukládat v buněčné kultuře; malá množství pocházející z množství rozdílných zdrojů, která jsou samostatně netoxická, mohou při zkombinování v médiu překonat detoxikační kapacitu buněčné kultury a vést ke změnám indukovaným toxickým stresem nebo dokonce ztrátě kultury.

Biologické kontaminanty

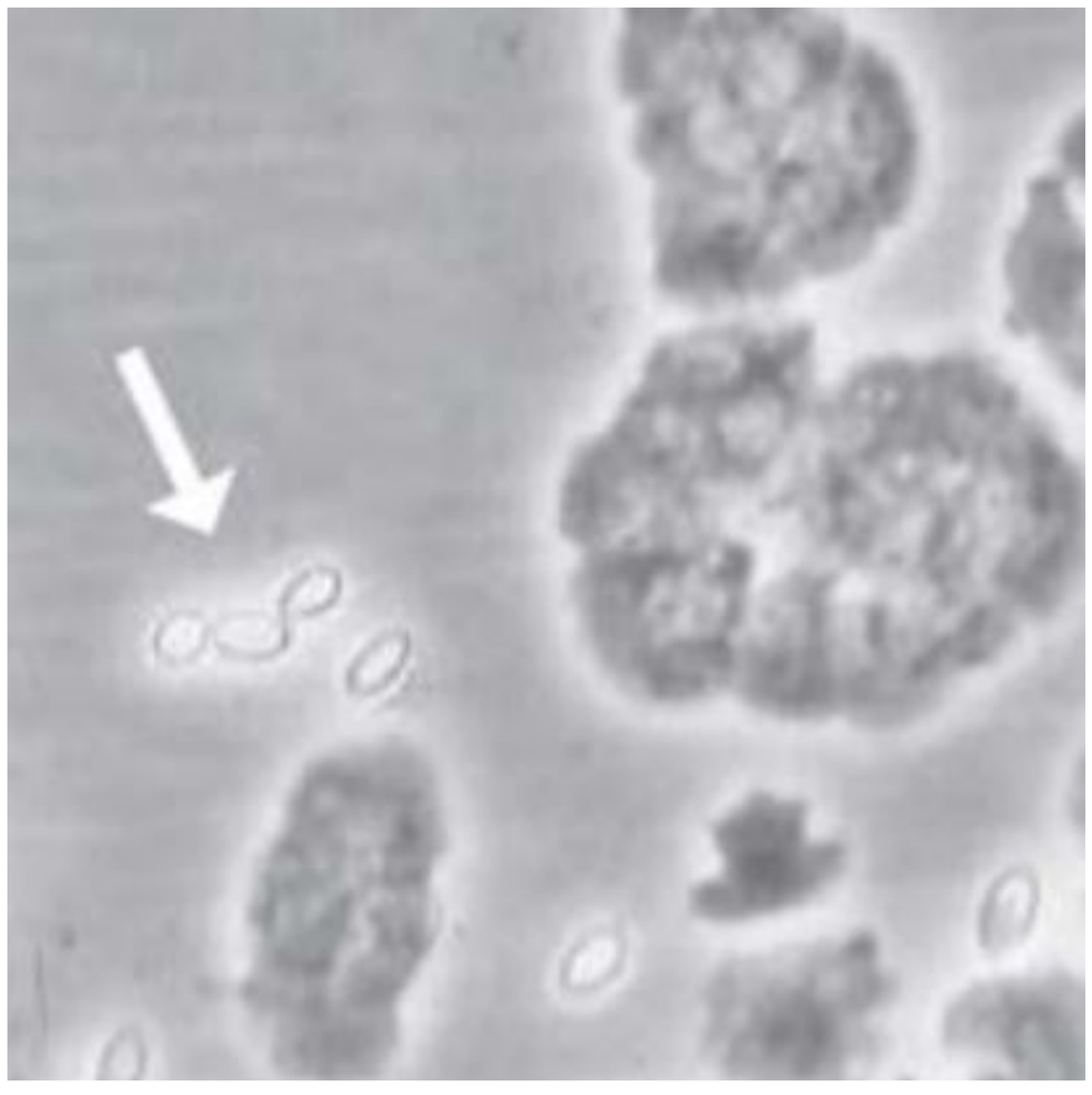
Biologická kontaminace může být podrobněji rozdělena na dvě skupiny založené na obtížnosti její detekce v kultuře:

1. většinou snadno detekovatelná kontaminace - bakterie, kvasinky, plísně;
2. většinou velmi obtížně detekovatelná kontaminace a potenciální zdroj vážných kultivačních problémů - viry, prvoci, hmyz, mykoplazma a jiné buněčné linie.

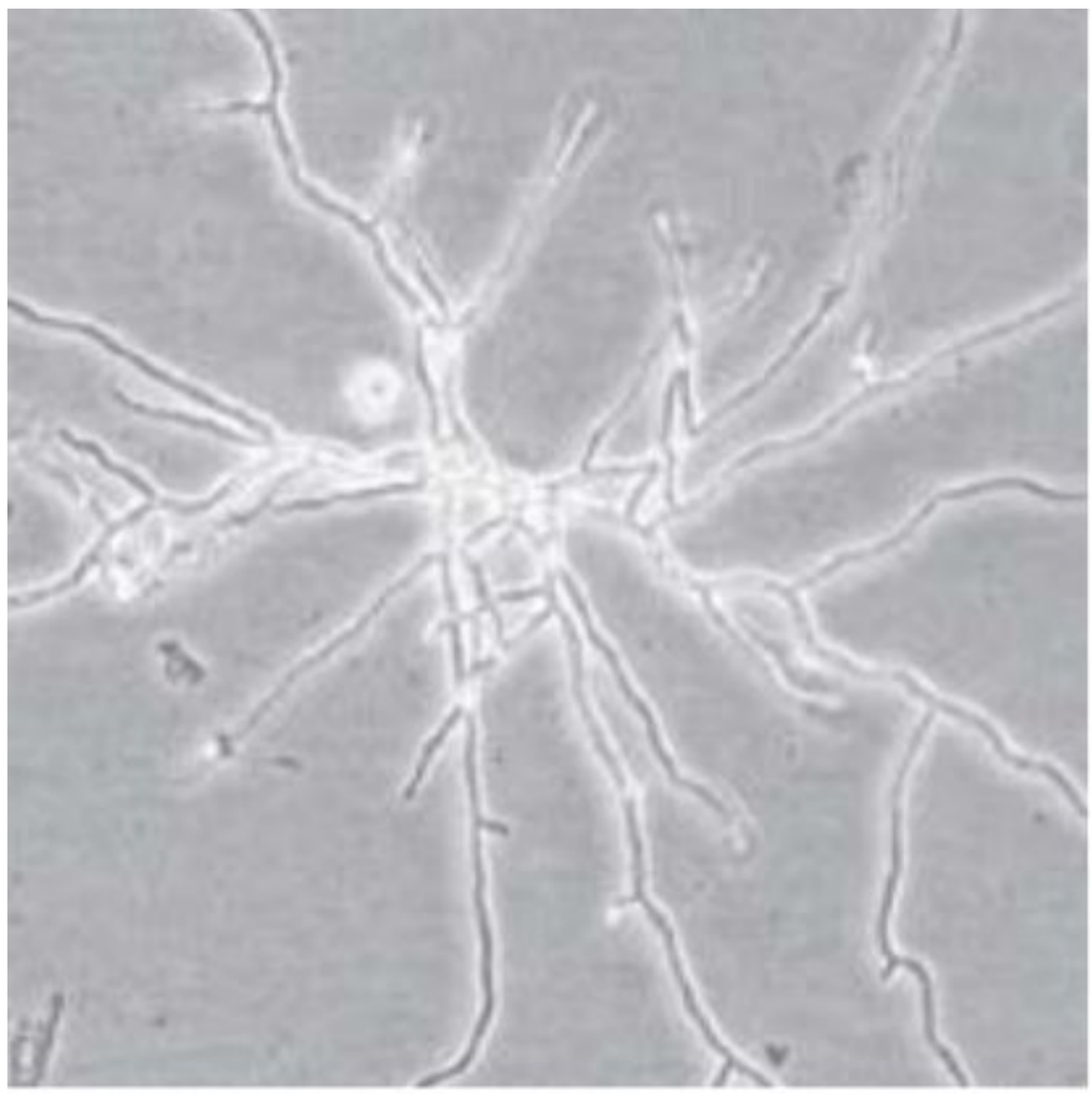
Podrobné shrnutí problematiky v odkazech 7 a 8.

BAKTERIE, KVASINKY A PLÍSNĚ

Bakterie, plísně a kvasinky jsou prakticky všudypřítomné a jsou schopny rychle kolonizovat a prosperovat v bohatém a relativně bezbranném prostředí buněčných kultur. Díky své velikosti a rychlému růstu jsou tyto mikroorganismy nejběžnější kontaminací buněčných kultur, s jakou se můžete setkat. Při absenci antibiotik by mikroorganismy měly být v kultuře snadno detekovatelné několik dní od kontaminace, buď přímým mikroskopickým pozorováním, nebo změnami způsobenými v kultuře (změna pH, zákalu a destrukce buněk, viz **obr. 1 a 2**).



Obrázek 1: *Mikrosnímek nízkoúrovňové kvasinkové infekce v linii jaterních buněk (PLHC-1, ATCC® # CRL-2406TM). Pučící buňky kvasinek jsou označeny šipkou. Na této nízké úrovni kontaminace není změna zákalu kultivačního média vidět, nicméně bez přídavku antibiotik by k viditelnému zákalu pravděpodobně došlo, a to už během jednoho dne.*



Obrázek 2: *Mikrosnímek malé plísňové kolonie rostoucí v buněčné kultuře. V tomto okamžiku je kolonie pro přímé vizuální pozorování stále neviditelná. Pokud by v tomto okamžiku byla kultura pasážována, všechny kultury a experimenty z ní získané by byly brzy ztraceny v důsledku plísňové kontaminace.*

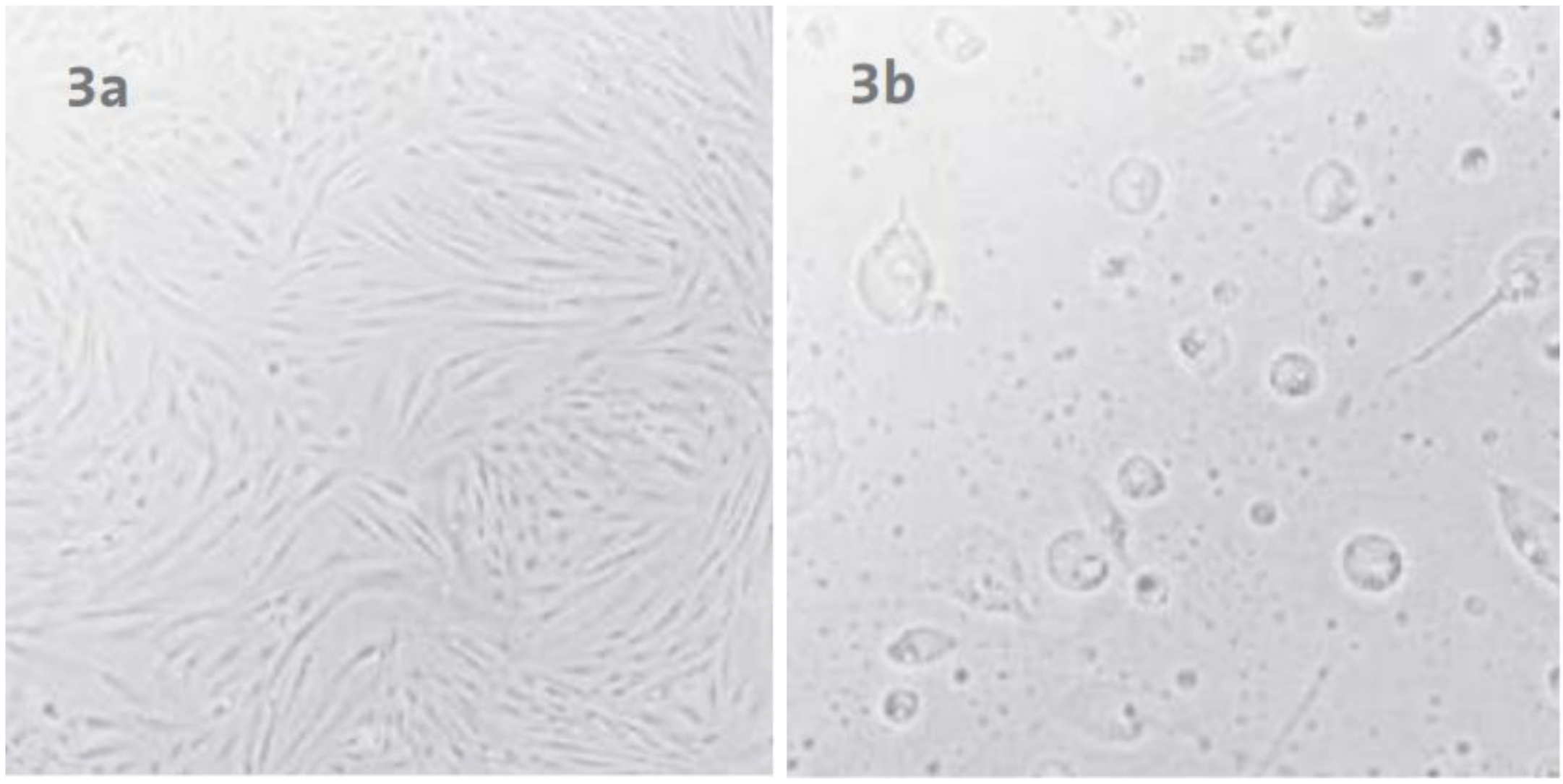
Kontaminanty, které zůstávají nezjištěny, jsou zdaleka nejzávažnějším problémem buněčné kultivace. Ve výsledku je to až doba, po kterou kontaminace unikala odhalení, která určuje rozsah škod, které napáchala ve Vaší laboratoři, na výzkumných projektech a nebo Vaší reputaci. (Obsáhlejší přehled viz reference 7 a 8.)

Nicméně i při rutinním použití antibiotik při kultivaci mohou rezistentní mikroorganismy vést k malé, pomalu rostoucí infekci, která je přímým vizuálním pozorováním jen velmi obtížně zjistitelná. Podobný problém s detekcí mohou vykazovat přirozeně pomalu rostoucí organismy nebo velmi malé či intracelulární bakterie, které je během rutinního mikroskopického pozorování kultury velmi těžké vidět. Tato skrytá kontaminace se může vyskytovat v kultuře dlouhodobě a může způsobovat drobné, avšak signifikantní odchylky v jejím chování. Až bude po čase tato skrytá kontaminace odhalena, mnoho experimentů a kultur bude zpětně zkompromitováno.

VIRY

Díky svým extrémně malým rozměrům jsou viry nejobtížněji detekovatelnou kontaminací buněčných kultur, přičemž detekce vyžaduje metody, které jsou ve většině výzkumných laboratoří neproveditelné. Jejich malá velikost je též činí velmi obtížně odstranitelnými z média, séra a jiných roztoků biologického původu. Běžně má většina virů striktní požadavky na buněčné pochody jejich původního hostitelského druhu (mohou být též tkáňově specifické), což velmi limituje jejich schopnost infikovat buněčnou kulturu jiného druhu. Ačkoliv mohou být viry v buněčných kulturách běžnější, než si většina vědců myslí, **nejsou považovány** za vážný problém, pokud nemají cytopatický nebo jinak nežádoucí efekt na kulturu. [shrnuto v 7, 40] Nicméně Uphoff a kol.[46] při prozkoumání 577 lidských buněčných linií na přítomnost virů myší leukemie (murine leukemia viruses, MLV) zjistili, že devatenáct (3,3 %) bylo kontaminováno MLV. Sedmnáct těchto buněčných linií vykazovalo produkci aktivních retrovirů určených pomocí RT-PCR detekce reverzní transkriptázové aktivity (product-enhanced reverse transcriptase PCR assay). Domnívají se, že nejpravděpodobněji stojí za MLV kontaminací pasážování lidských nádorových buněk s imunodeficientními myšmi ke zjištění rakovinotvornosti buněk. Je také možné, že je důvodem použití vrstev myších podpůrných buněk v průběhu vytváření lidských buněčných linií nebo jde o praktiku, v rámci které se snaží zbavit kontaminovaných buněčných linií pasážováním přes myši. Mohlo by jít o potenciální a vážný problém pro linie lidských kmenových buněk rostoucích na myších podpůrných vrstvách.

Jelikož cytopatické viry většinou zničí infikovanou kulturu, samy se tím omezují. Pokud dojde k samovolnému zániku kultury bez zjevného důvodu a nejsou zde důkazy běžné biologické kontaminace, za viníky jsou obvykle označeny skryté viry (**obr. 3a a 3b**). Viry jsou perfektními viníky, jsou neviditelné a nezjistitelné; vinné bez přímého důkazu. To je velmi nešťastné, jelikož skutečným důvodem zničení kultury může být něco úplně jiného, třeba mykoplazma nebo chemická kontaminace. A pokud se na ni nepřijde, může ve výsledku způsobit mnohem závažnější problémy.



Obrázek 3a a 3b: *Mikrosnímek buněčné kultury fibroblastového typu platýse amerického (Pseudopleuronectes americanus). Obrázek 3a zobrazuje očividně zdravou, čerstvě pasážovanou kulturu. Obrázek 3b ukazuje tutéž kulturu cca o 24 hod později. Elektronová mikroskopie v těchto buňkách odhalila částice podobné virům. Mnohočetné pokusy vytvořit buněčnou linii z tohoto druhu byly neúspěšné a vykazovaly cytopatický efekt, podle všeho způsobený neznámým virem.*

Hlavní obavy z používání buněčných kultur infikovaných viry neplyne z efektů na kulturu, ale spíše z potenciálního zdravotního rizika, které představují pro laboratorní personál. Při práci s tkáněmi nebo buňkami, které pocházejí z lidí nebo primátů, by měla být vždy zavedena zvláštní bezpečnostní opatření, aby se zamezilo možnému přenosu virových infekcí (HIV, hepatitida B, virus Epstein-Barrové, opičí herpesvirus B a další) z buněčných kultur na laboratorní personál.[9] Pokud máte pochybnosti o vhodných postupech při práci s potenciálně rizikovými tkáněmi, kulturami nebo viry, obraťte se na příslušný bezpečnostní úřad/zařízení.[44, 49]

PRVOCI

Volně se vyskytující i parazitičtí jednobuněčné prvoci, např. améby, mohou být čas od času identifikováni jako kontaminace kultury. Améby, obvykle půdního původu, mohou tvořit spory a jsou snadno izolovatelné ze vzduchu, občas ze tkání, a stejně tak z výtěrů krku a nosu laboratorního personálu. Mohou způsobit cytopatické efekty podobné virovému poškození a během deseti dnů kompletně zničit kulturu. Neexistuje-li na tuto kontaminaci podezření, jsou améby díky pomalému růstu a morfologické podobnosti s kultivovanými buňkami v kultuře jen velmi obtížně zjistitelné.7 Naštěstí jsou hlášené případy tohoto typu kontaminace velmi vzácné, je však důležité být na možnost jejího výskytu připraven.

BEZOBRATLÍ

Hmyz a pavoukovci běžně se vyskytující v laboratorních prostorech, především mouchy, mravenci, švábi a roztoči, mohou sami kontaminovat kulturu, či být významným zdrojem mikrobiální kontaminace. Častým zdrojem zamoření jsou inkubační místnosti. Pobíháním dovnitř a ven z kultivačních nádob a sterilních zásob při hledání potravy či úkrytu mohou náhodně šířit mikrobiální kontaminaci. Občas jsou odhaleni na základě cestiček a stop (mikrobiálních kolonií), které zanechali na agarových plotnách, většinou však nezanechávají žádné jiné viditelné známky své návštěvy než náhodnou mikrobiální kontaminaci. Roztoči mohou být vážným problémem v zařízeních s rostlinnými buněčnými kulturami, zejména v těch, které množí rostliny ve velkém množství. Ačkoliv bakterie, kvasinky a plísně občas zanechávají dojem, že „přeskakují“ z kultury do kultury, tyto vícenohé kontaminanty skutečně mohou. I když nejsou tak běžní jako jiné kontaminanty kultur, je důležité si na přítomnost těchto bezobratlých v kultivačních prostorech dávat pozor.

MYKOPLAZMY

Mykoplazmy byly poprvé detekovány v buněčných kulturách Robinsonem a jeho spolupracovníky v roce 1956. Pokoušeli se studovat efekty PPLO (pleuropneumonia-like organisms – původní název mykoplazmy) na HeLa buňkách, když zjistili, že kontrolní HeLa kultura již byla PPLO kontaminována.[10] Navíc zjistili, že byly též infikovány další buněčné linie v té době používané v jejich laboratoři, což je běžná vlastnost kontaminace mykoplazmou. Na základě testování mykoplazmy provedené FDA, ATCC a dvou hlavních společností testujících buněčné kultury bylo zjištěno, že nejméně 11-15 % buněčných kultur v té době používaných ve Spojených státech bylo infikováno mykoplazmou (**tab. 1**). Jelikož mnoho z těchto kultur bylo z laboratoří, které rutinně na mykoplazmata testovaly, aktuální počty jsou pravděpodobně vyšší v mnoha laboratořích, kde netestují vůbec.[11-13] V Evropě byly hodnoty kontaminace mykoplazmou ještě vyšší: přes 25 % z 1949 kultur z Nizozemska a 37 % z 327 kultur z bývalého Československa bylo pozitivních.[14] Československá studie měla zajímavá, byť typická zjištění: 100 % kultur z laboratoří bez programu testování mykoplazmy bylo kontaminováno, ale pouze 2 % kultur z laboratoří, kde testovali pravidelně. Další země jsou na tom hůře: podle dalších studií bylo mykoplazmou kontaminováno 65 % kultur v Argentině a 80 % v Japonsku.[11]

Bohužel, mykoplazmy nejsou pouze relativně neškodné kontaminanty, ale právě naopak. Mají schopnost změnit u hostitelské buněčné kultury funkce, růst, metabolismus, morfologii, přilnavost, membrány, uvolňování virů a jejich množství, indukce a množství interferonů, chromozomální anomálie a poškození a cytopatické efekty včetně tvorby plaků.[12] Tedy správnost jakéhokoliv výzkumu provedeného s těmito nevědomky infikovanými kulturami je přinejlepším pochybná. (Více v referencích 11, 12 a 15-18 pro lepší přehled v problematice velmi vážných kontaminací mykoplazmou.)

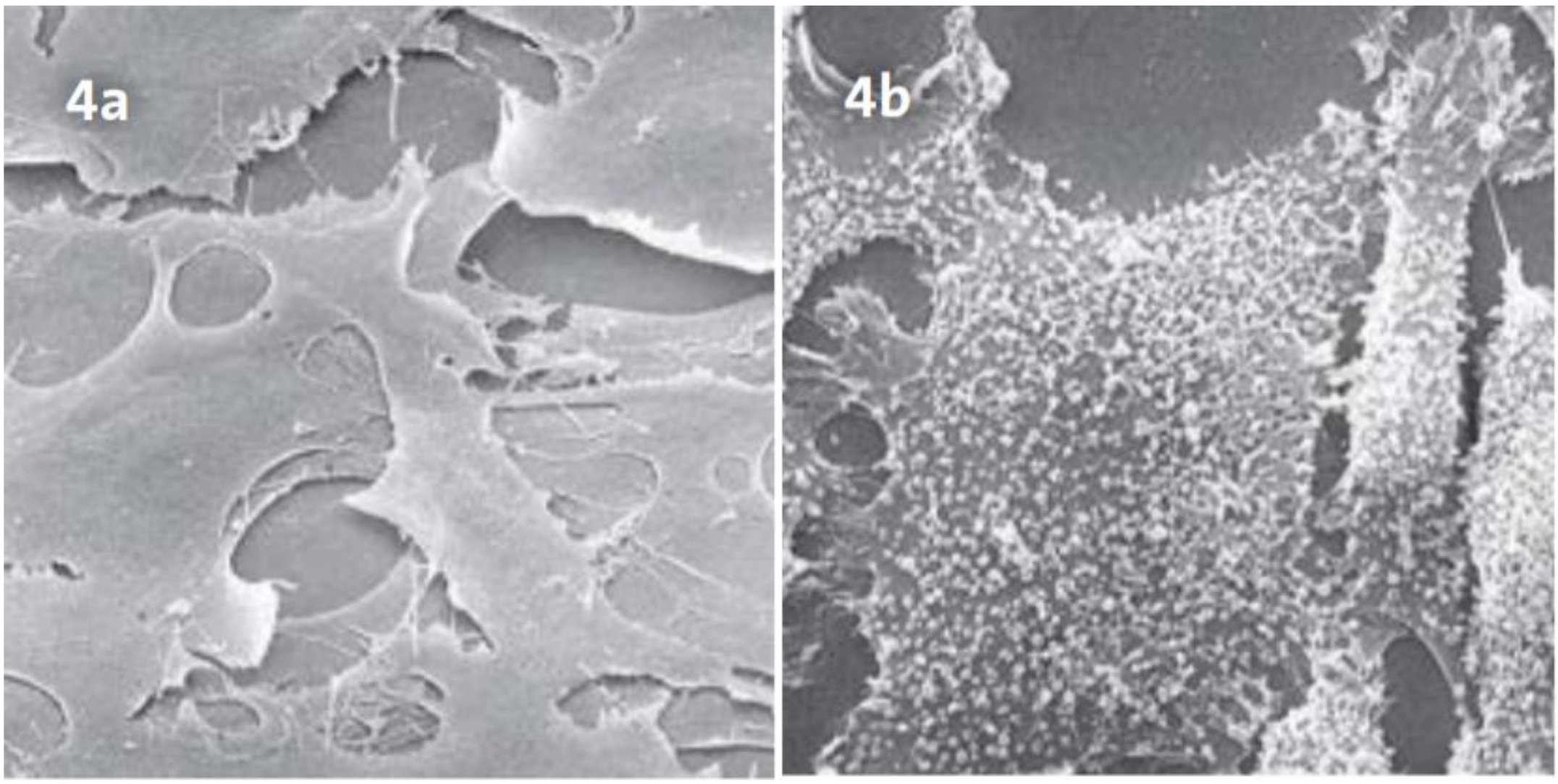
Co dává mykoplazmám schopnost tak snadno infikovat tolik kultur? Tři základní vlastnosti:

a) tito jednoduší, bakteriím podobní mikrobi, jsou nejmenší známý organismus, který se sám dělí (0,3-0,8 μm v průměru);

b) chybí jim buněčná stěna;

c) jsou nároční v růstových požadavcích.

Malá velikost a absence buněčné stěny umožňuje mykoplazmám narůst v buněčné kultuře do velmi vysokých denzit (hodnoty 10^7 až 10^9 kolonie tvořících jednotek/mL jsou běžné), často bez viditelných známek kontaminace – žádný zákal, změny pH či cytopatické efekty (**obr. 4a a 4b**). Samotné pozorné mikroskopické pozorování živých buněčných kultur nemůže odhalit jejich přítomnost. Tyto dvě stejné vlastnosti činí mykoplazmy, stejně jako viry, velmi obtížně zcela odstranitelné ze séra membránovou filtrací.[48] Jejich striktní růstové požadavky (bohužel snadno splnitelné buněčnou kulturou) je navíc činí velmi obtížně pěstovatelné a detekovatelné s použitím standardních kultivačních metod. Tyto tři jednoduché vlastnosti tedy v kombinaci s jejich schopností pozměnit prakticky každou buněčnou funkci a parametr, činí z mykoplazem nejzávažnější, nejrozšířenější a nejničivější kontaminaci kultur.



Obrázek 4a a 4b: *Tento snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu zobrazuje buňky 3T6 (ATCC® # CCL-96TM) s mykoplazmovou infekcí (4b) a bez ní (4a). Zde uvedená úroveň kontaminace buněk mykoplazmou je pro kontaminované buňky typická. Zkoumání této kontaminované kultury mikroskopem s fázovým kontrastem důkazy kontaminace neukázalo, stejně tak nevykazovalo médium žádné změny zákalu.*

Mykoplazmy jsou popisovány jako „plevel“ buněčné kontaminace, což je velmi mírný popis pro nejvýznamnější a nejrozšířenější kontaminantu buněčných kultur na světě. Bohužel i přes pokroky v detekčních metodách (bude rozebráno podrobněji) se míra infekce mykoplazmou (**tab. 1**) od doby, kdy byla poprvé zaznamenána v buněčné kultuře, výrazně nezměnila. Agresivní postup proti kontaminaci mykoplazmou musí být hlavní předmět zájmu každého programu řízení kvality laboratoře pracující s buněčnými kulturami.[16]

Počet testovaných kultur		Počet pozitivních
Food and Drug administration (FDA) (od 70. do 90. let) (11)	20 000	přes 3 000 (15 %)
Bionique Testing Laboratories (několik let před rokem 1993) (41)	11 000	1 218 (11,1 %)
Microbiological Associates (1985 - 1993) (13)	2 863	370(12,9 %)
ATCC (1989 až 1994) (42)	5 362	752 (4 %)

Tab 1.: *Kontaminace buněčných kultur mykoplazmou*

KŘÍŽOVÁ KONTAMINACE JINÝMI BUNĚČNÝMI KULTURAMI

S příchodem vylepšených karyotipizačních metod na sklonku padesátých let začalo být brzy zřejmé, že některé buněčné linie jsou křížově kontaminovány buňkami jiných druhů.[7] V roce 1966 použil Gartler izoenzymovou analýzu, aby ukázal, že 20 běžně užívaných lidských buněčných linií bylo vnitrodruhově kontaminováno HeLa buňkami.[19, 20]

Kontaminace je vlastně nesprávné označení, jelikož bylo ve skutečnosti 100 % původních buněk nahrazeno HeLa kontaminací. Bohužel vědecká komunita zareagovala na tento vážný problém pomalu. Testy provedené v jednom výzkumném středisku na 246 buněčných liniích v průběhu 18 měsíců k roku 1976 ukázaly, že téměř 30 % bylo chybně označeno: 14 % byl špatný druh a 25 % lidských buněčných linií byly HeLa buňky.[21] Průzkum kultur v roce 1981 odhalil více než 60 buněčných linií, které byly ve skutečnosti HeLa buňky, 16 dalších lidských buněčných linií kontaminovaných non-HeLa lidskými buněčnými liniemi a 12 případů mezidruhové kontaminace (**viz seznam na následující stránce**).

Problém není omezen pouze na kontaminaci HeLa buňkami. Nástup analýzy DNA ukázal, že buňky z různých zdrojů jsou kontaminovány množstvím jiných buněčných linií.[42] Databáze křížově kontaminovaných nebo chybně identifikovaných linií (Database of Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines; od prosince 2016) spravovaná Mezinárodní komisí pro autentizaci buněčných linií (International Cell Line Authentication Committee, ICLAC) (iclac.org/databases/cross-contaminations) uvádí 488 buněčných linií, které jsou křížově kontaminované nebo chybně určené.[52] Každý vědec používající buněčné linie by je měl zkontrolovat na těchto stránkách nejméně jednou ročně k potvrzení jejich správnosti.

Některé buněčné linie kontaminované HeLa:

- Detroit 6 (CCL-3)
- Minnesota-EE (CCL-4)
- L132 (CCL-5)*
- Intestine 407 (CCL-6)*
- Chang Liver (CCL-13)
- KB (CCL-17)*
- Detroit 98 (CCL-18)
- NCTC 2544 (CCL-19)
- Conjuctiva (CCL-20.2)*
- AV3 (CCL-21)*
- HEp-2 (CCL-23)*
- J-111 (CCL-24)
- WISH (CCL-25)*
- Giardia Heart (CCL-27)
- Wilm’s Tumor (CCL-31)
- FL (CCL-62)*

CCL čísla jsou označení v ATCC katalogu. Vše s výjimkou CCL-20.2, CCL-31 a CCL-62 prokázal jako HeLa Gartler v roce 1968.20 Linie označené hvězdičkou jsou k nalezení v Cell Biology Collection na webové stránce ATCC (www.atcc.org), kde jsou označeny jako HeLa kontaminanty.

Závažnost křížové kontaminace, ač není tak běžná jako mikrobiální kontaminace, zveličována není. Věrohodnost experimentálních výsledků z kultur s vnitro- nebo mezidruhovou kontaminací je přinejmenším sporná. Krom toho může vést jejich užívání k nepříjemnostem se stažením publikovaných výsledků. Většinou jsou proniknuvší buňky lépe adaptované na kultivační podmínky a tedy rychleji rostoucí než původní buňky, takže je téměř vždy kompletně nahradí. Z důvodu vnější fyzické podobnosti různých buněčných linií a velké variabilitě morfologie v závislosti na kultivačních podmínkách je nemožné spoléhat se pouze na mikroskopické pozorování při snaze odhalit křížovou kontaminaci kultur. Drobné nehody jsou jedním z nejčastějších prostředků, jak se jiná buněčná linie dostane do kultury, a budou probrány odděleně v následující části.

Nezapomeňte, že závažnost každé kontaminace kultury je většinou přímo úměrná obtížnosti její detekce; ty, které zůstávají neodhaleny nejdéle, mívají nejzávažnější následky. Kultury obsahující neletální (ale ne neškodnou) skrytou chemickou nebo biologickou kontaminaci jsou občas používány pro výzkum po měsíce či roky před jejím odhalením. Kvalita a spolehlivost všech výzkumů s těmito kulturami z tohoto období je znehodnocena, stejně jako reputace vědců, kteří je používali.

ČÁST 2: Jaké jsou zdroje biologické kontaminace?

Ke snížení četnosti biologické kontaminace je důležité znát nejen podstatu a identitu kontaminant, ale také odkud pochází a jakým způsobem vstupuje do kultury. V této části detailně probereme nejběžnější zdroje biologické kontaminace.[3]

Jak vstupují biologické kontaminanty do kultur?

- kontakt s nesterilními materiály, médii nebo roztoky
- spad částic nebo aerosolu v průběhu práce s kulturou, transportu nebo inkubace
- mikroorganismy plovoucí, lezoucí nebo rostoucí v kultivačních nádobách
- nehody a omyly

NESTERILNÍ SLOŽKY, MÉDIA A ROZTOKY

Bezděčné použití nesterilních materiálů, médií nebo roztoků během rutinních kultivačních procedur je hlavním zdrojem biologické kontaminace. Kontaminace těchto produktů může být výsledkem nedostatečné sterilizace nebo chybného skladování, případně mohou být kontaminovány v průběhu užívání.

Laboratorní sklo, včetně skladovacích lahví a pipet, je převážně sterilizováno autoklávováním nebo tepelně za sucha. Případy vážné kontaminace jsou často vysledovány k nesprávné obsluze nebo činnosti autoklávu nebo sterilizátoru. Přeplňování autoklávu nebo sterilizátoru způsobuje nerovnoměrné zahřívání, které vede ke vzniku kapes s nesterilním obsahem. Běžnou chybou je použití příliš krátkého sterilizačního programu, především při autoklávování roztoků o objemu větším než 500 mL v nádobě nebo roztoků obsahujících pevné nebo viskózní materiály, jako jsou agary nebo škroby.

Vždy musí být vzata v úvahu velikost, hmotnost, původ a objem sterilizovaného materiálu a časový cyklus vhodně přizpůsoben k dosažení sterility.[23, 60] Jednou získaná sterilita musí být zachována vhodným skladováním materiálu a roztoků v prostorech bez prachu a hmyzu jakožto prevence kontaminace. Také je vhodné se vyvarovat kondenzace na lahvích s roztoky skladovanými v chladničkách a chladících místnostech. Samozřejmě jsou doporučeny i vhodné aseptické postupy k zachování sterility již sterilních zásob a roztoků při jejich užívání.

Jednorázové plastové kultivační nádoby, pipety, centrifugační kyvety atd. jsou většinou sterilizovány výrobcem za použití zdroje velmi intenzivní gama nebo elektronové radiace jakmile jsou uzavřeny do balení. Je to velmi spolehlivý způsob a při otevírání a opětovném uzavírání obalu je třeba dbát opatrnosti, aby nedošlo ke kontaminaci produktů uvnitř.

Většina médií, sér a jiných živočišných biologických látek není tepelně sterilizovatelná a vyžaduje k odstranění biologické kontaminace membránovou filtraci. Použitelná je též radiace. Produkty sterilizované filtrací ve Vaší laboratoři by vždy měly být před použitím testovány na sterilitu (podrobněji níže); komerčně dodávané sterilní produkty jsou před prodejem testovány výrobcem. Ačkoliv filtrace přes 0,2 µm membránu je velmi efektivní při odstranění většiny biologických kontaminant, nezaručuje kompletní odstranění virů a mykoplazmy, a to především ze séra.[16, 18, 24] V perfektním souhrnu úrovně a zdrojů kontaminace mykoplazmou[25] zjistili Barile a jeho spolupracovníci, že 104 z 395 testovaných šarží (26 %) komerčního fetálního hovězího séra bylo kontaminováno mykoplazmou. Začátkem sedmdesátých let vyvodili, že zvířecí séra jsou hlavním zdrojem kontaminace buněčných kultur mykoplazmou. Mnoho výrobců sér zareagovalo na tento problém v následující dekádě zavedením filtračních a testovacích procedur; v současnosti používají k odstranění mykoplazmy sérii filtrací přes nejméně tři filtrační membrány s póry o průměru 0,1 µm nebo menší. Tento přístup se ukázal být velmi úspěšným při snižování problému mykoplazmy v sérech a dalších živočišných produktech.[16, 54] I když tyto produkty již nejsou hlavním zdrojem kontaminace mykoplazmou, stále musí být považovány za potenciální zdroje a je nutné je zkontrolovat, jakmile je mykoplazma detekována v kultuře.

VZDUŠNÉ ČÁSTICE A AEROSOLY

Ve většině laboratoří jsou největšími zdroji mikrobiální kontaminace vzdušné částice a aerosoly tvořící se během manipulace s kulturami. Mikroby pokryté částice jsou relativně velké (obvykle od 4 do 28 µm v průměru) a usazují se tempem přibližně 30 cm za minutu v nehybném vzduchu. Ve výsledku je v uzavřené místnosti nebo laboratoři bez průvanu (žádní lidé, otevřená okna nebo dveře, klimatizace a vzduchotechnika atd.) vzduch prakticky bez biologické kontaminace. Nicméně jakmile do místnosti nějaká osoba vstoupí, usazené částice se snadno rozptýlí. Navíc některé vybavení a aktivity mohou produkovat velké množství částic a aerosolů obsahujících mikroby: pipetovací zařízení, vakuové pumpy a odsávačky, centrifugy, míchačky, sonikátory, a tepelné zdroje jako radiátory, trouby, chladničky a mrazáky. Zařízení pečující o zvířata a zvířata v nich umístěná jsou též vážnými producenty částic a aerosolů a měla by být držena pokud možno co nejdále od kultivačních prostor.

McGarrity použil buněčnou kulturu záměrně infikovanou mykoplazmou jako model pro studium toho, jak se mykoplazmy šíří v boxech s laminárním prouděním vzduchu během běžných kultivačních procedur.[26] (Tato reference je doporučena pro lepší porozumění způsobu šíření mykoplazmy v laboratoři.) Po trypsinizaci infikované kultury v laminárním boxu byly živé mykoplazmy izolované z laboranta, vnějšku lahve, hemocytometru, pipetoru a na vnějšku odpadní nádoby na špičky. Živé mykoplazmy mohly být úspěšně získány z povrchu laminárního boxu čtyři až šest dní poté. Čistá kultura, která byla po práci s kontaminovanými buňkami souběžně pasážována jednou týdně ve stejném boxu, byla pozitivně testována na mykoplazmu po pouhých šesti týdnech. Z této studie je snadné pochopit, jak vstup jedné mykoplazmou infikované kultury do laboratoře může rychle vést k infekci všech ostatních kultur v laboratoři. To vysvětluje časté případy toho, že pokud je jedna z kultur v laboratoři kontaminována mykoplazmou, většina, ne-li všechny ostatní kultury, jsou také. **V současnosti je hlavním zdrojem kontaminace mykoplazmou infikovaná kultura získaná z jiné výzkumné laboratoře.**

Dalším hlavním zdrojem částic a aerosolů je laboratorní personál. Venkovní oblečení a špinavé laboratorní pláště jsou magnetem na prach. Vložení rukávu pokrytého prachem do laminárního boxu vyprodukuje oblak prachových částic, které mohou snadno spadnout do kultury a kontaminovat ji během rutinních činností. Mluvení a kýchání může produkovat významné množství aerosolu, který, jak bylo ukázáno, může obsahovat mykoplazmu.[26] Zdrojem kontaminace mykoplazmou je také pipetování ústy, které je navíc rizikem pro personál a nemělo by tedy být dovoleno za žádných okolností. Suchá odlupující se kůže je dalším zdrojem kontaminujících částic; tento běžný jev je zhoršen častým mytím rukou vyžadovaným v laboratoři; dokonce i přípravky navržené k hydrataci suché kůže jsou příležitostně kontaminovány. Rutinně nošené čisté rukavice před prací v boxu jsou pro bezpečnost personálu a prevenci kontaminace vysoce doporučeny. Některý laboratorní personál trousí částice obsahující kvasinky ještě několik dní po domácím pečení chleba nebo vaření piva. Kultivační pokusy těchto jedinců v tomto období často končí selháním v důsledku kontaminace kvasinkami.

Inkubátory, především ty provozované s vysokou vlhkostí, mohou být významným zdrojem biologické kontaminace v laboratoři. Špinavé zásobníky na vodu, police nebo kultivační nádoby potřísněné rozlitým médiem, to vše umožňuje růst sporotvorným plísním. Ventilátory používané v mnoha inkubátorech k cirkulaci vzduchu a prevenci rozvrstvení teplot mohou tyto spory a další částice šířit. Některé inkubátory zvlhčují příchozí plyny probubláváním přes vodní nádrže na dně inkubátoru; takto generované aerosoly mohou rychle rozšířit veškeré kontaminanty obsažené ve vodě.

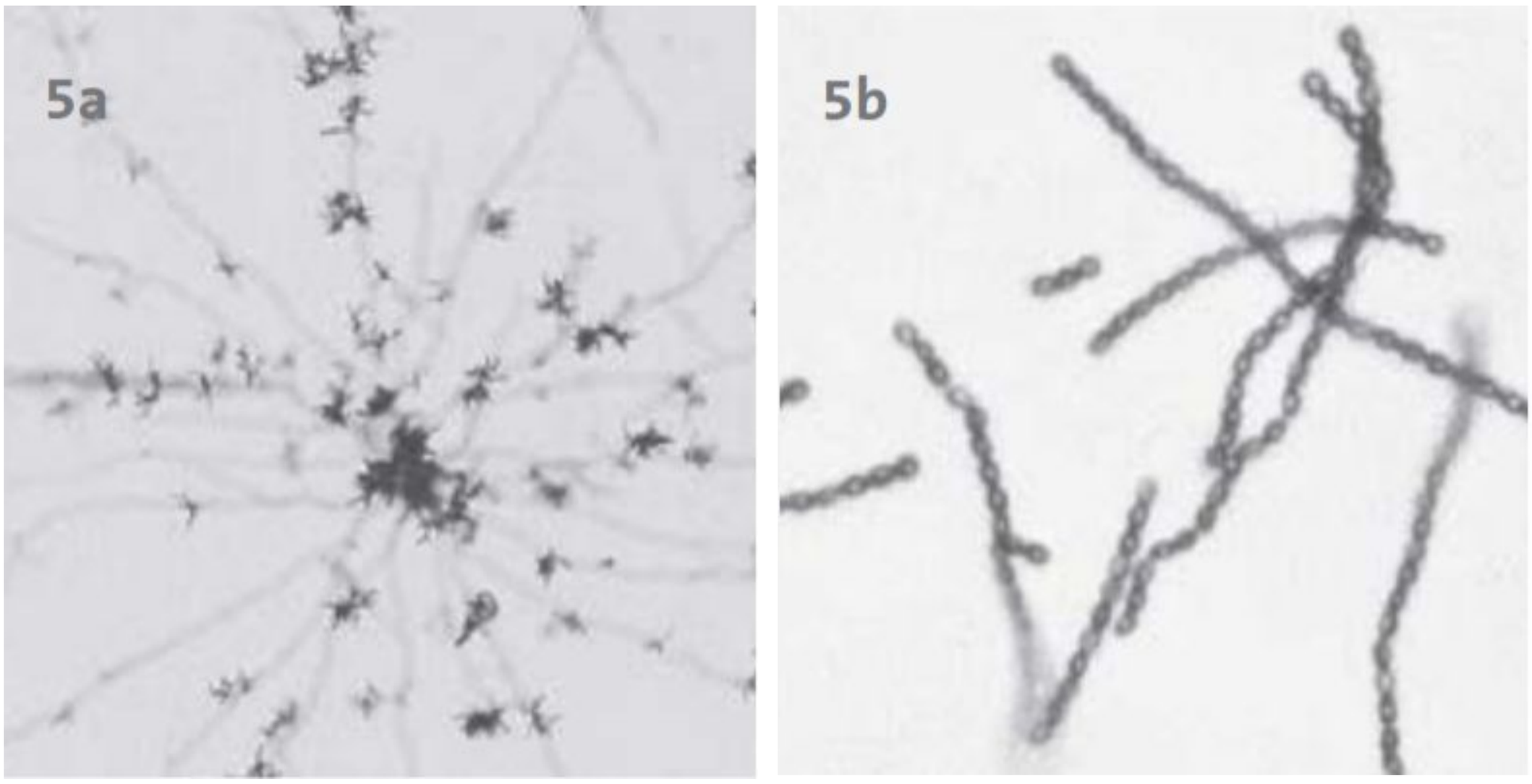
Jestliže laminární boxy a inkubátory představují hlavní místo, kde se objevuje biologická kontaminace, přenos kultur mezi těmito dvěma místy též představuje příležitost pro kontaminaci. Většina laboratoří kultivujících buňky se velmi tvrdě snaží udržet své inkubátory a laminární boxy čisté, občas ale přehlížejí potenciální zdroje kontaminace ležící v méně čistých prostorách laboratoří a přinášené chozením z jedněch prostor do druhých.

Místnosti obsahující otevřená okna, klimatizace, pracovní prostory pro mikrobiologickou a molekulárně biologickou práci, a jiné hlavní zdroje částic zmiňované dříve, přináší potenciální nebezpečí pro kultury pohybující se napříč laboratoří. Tento problém též zvyšují vzdálenost přenosu a neprodyšně nezakryté kultivační nádoby jako jsou Petriho misky a mikrodestičky.

MIKROORGANISMY PLOVOUCÍ, ROSTOUCÍ A LEZOUCÍ V KULTURÁCH

Neprodyšně nezakryté plotny a misky, stejně jako lahve s povolenými uzávěry kvůli výměně plynů, představují další běžnou cestu kontaminant pro vstup do kultur. Velmi snadno pak prostor mezi vrchní a spodní částí bočních stěn misky nebo lahví a jejím uzávěrem zvlhne díky kapilárním silám média nebo kondenzace. Tato tenká vrstva kapaliny pak tvoří tekutý most nebo dálnici pro mikroorganismy plovoucí nebo rostoucí v kultivační nádobě.

I bez přítomnosti detekovatelné kapalné vrstvy mohou plísně, stejně jako jiné mikroorganismy, růst z vnějšku kultivačních nádob (**obr. 5a a 5b**); případně jejich hyfy rostou nahoru po stěně misky nebo dolů z uzávěru do hrdla lahve. Toto je často vidět u dlouhotrvajících kultivací (měsíc a více) prováděných ve stejných, nedostatečně uzavřených lahvích. Velmi malý hmyz a jiní bezobratlí mohou též uskutečnit dočasnou návštěvu neuzavřených kultur, především misek a destiček, a zanechat za sebou (pokud nespadnou dovnitř a neutopí se) pouze kontaminanty přenášené na jejich končetinách.



Obrázek 5a a 5b: *Mikrosnímek kontaminantů rostoucích na vnějším povrchu kultivačních nádob. Tyto organismy mohou případně přerůst do kultury.*

NEHODY

Nehody jsou jako významný zdroj problémů buněčných kultur často přehlíženy. Nehoda je definována jako „nechtěná nebo nešťastná událost, bezděčně způsobená a většinou končící újmou, poškozením, zraněním nebo ztrátou“ (Webster’s Encyclopedic Unabridged Dictionary, 1989). Nehody spojené s buněčnou kultivací jsou ty, které vedou ke křížové kontaminaci jinými buněčnými kulturami. Následující skutečné případy demonstrují, jak relativně jednoduché nehody mohou vyústit ve vážný problém křížové kontaminace:

- Laborant si vzal vialku označenou WI-38 z mrazáku s tekutým dusíkem v domnění, že obsahuje široce používanou diploidní lidskou buněčnou linii. Při kultivaci pak bylo náhle zjištěno, že jde o rostlinnou buněčnou linii odvozenou od běžného druhu tabáku nazývaného Wisconsin 38, taktéž označenou WI-38.

- Dvě samostatné výzkumné laboratoře, obě se snažící vytvořit buněčnou linii z primární kultury, sdílejí inkubační místnost. Jedna laboratoř používá zkratky HL-1, HL-2, atd. k označení primárních kultur odvozených z lidských plic (human lung). Druhá laboratoř pracující s kulturami odvozenými z lidských jater (human liver) též (nevědomky) používá stejný typ označení. Netrvalo dlouho a došlo k promísení kultur napříč oběma laboratořemi, což dokazuje důležitost pečlivého pojmenovávání buněčných linií.[podrobněji v 59]

Naštěstí oba výše popsané případy křížové kontaminace kultur, třebaže závažné, byly zachyceny dříve, než způsobily katastrofální problémy. Ale jak často se podobné nehody stanou a nejsou odhaleny? Na základě stále se objevujících zpráv z literatury[7, 8, 19-22] lze říci, že mnoho vědců na nalezení a nápravu svých omylů dost štěstí nemělo.

Výše uvedené informace by Vám měly dodat vyšší obezřetnost a porozumění původu biologické a chemické kontaminace a jejích závažných následků. Zbytek tohoto průvodce pokrývá některé základní myšlenky, techniky a strategie pro aktivní detekci a boj s kontaminací buněčných kultur ve Vaší vlastní laboratoři.

ČÁST 3: Jak může být kontaminace buněčných kultur kontrolována?

Buněčné kultury mohou být spravovány tak, aby se podařilo omezit frekvenci výskytu i závažnost problémů spojených s kultivací, především kontaminacemi. Chybějící základní správa kultivačních procedur, především ve větších laboratořích, běžně vede k dlouhotrvajícím problémům a činí kontaminaci pravděpodobnější. Řešením je aktivně řídit práci s kulturami za účelem snížení problémů, a pokud možno nastavit program práce ve Vaší laboratoři.[27, 28] Tento program by měl být navržen tak, aby pokrýval Vaše specifické pracovní potřeby a podmínky, a byl založen na Vašich minulých problémech s kulturami; může být velmi jednoduchý a neformální, nebo více strukturovaný, pokud je to nutné.

Prvním krokem řízení práce s kulturami je určit rozsah a původ ztrát kultur ve Vaší laboratoři. Každý v laboratoři by si měl vést měsíc nebo déle podrobné záznamy o všech problémech, které vedly ke ztrátě některé z kultur. A to bez ohledu na to, jak byly drobné nebo nepodstatné. Tyto problémy nemusí být spojené pouze s kontaminací, ale i s dalšími věcmi jako poruchy/selhání inkubátorů a vybavení. Dále shrňte problémy ve skupině a určete jejich původ, závažnost a četnost. Souhrnná zjištění mohou být překvapující: v tom, co se zdálo být jednotlivým, drobným a náhodným případem kontaminace se náhle objeví vzorec a ukáže se, že jde o rozsáhlejší problém, než si každý myslel. Toto sdílení problémů je často bolestivý proces, ale nezapomeňte, že cílem není hledat viníky, nýbrž si uvědomit rozsah a původ problémů, kterým laboratoř čelí. Kritickou částí tohoto procesu je porozumění závažnosti a skutečné ceny ztráty kultur; často je nutné nejprve finančně zhodnotit ztráty, než se ukáže plný rozsah škod. Je proto velmi důležité pro každého v laboratoři znát a plně chápat odpovědi na následující otázky:

- Kolik času, peněz a úsilí bylo investováno do vašich kultur a experimentů?
- Jaké jsou následky jejich ztráty/znehodnocení?
- Jak drahé nebo náročné by bylo je nahradit/zopakovat?

Jakmile jsou jednou následky a problémy v laboratoři lépe pochopeny, můžete se rozhodnout pro potřebu systému řízení práce, pokud je nezbytný. Základní způsoby řešení problémů[2] mohou pomoci identifikovat jejich zdroje; změny vedoucí k minimalizaci nebo prevenci znovu se objevujících problémů pak mohou být zavedeny.

Následující návrhy, koncepty a strategie kombinované se základními řídícími postupy mohou sloužit k redukci a kontrole kontaminace (**viz body níže**). Návrhy mohou vyžadovat modifikaci pro Vaše potřeby a situace.

Kroky ke snížení problémů s kontaminací:

- používejte vhodné aseptické postupy
- snižte počty nehod
- udržujte laboratoř čistou
- rutinně monitorujte kontaminaci
- používejte úložiště zamražených buněk s rozmyslem
- antibiotika používejte střídmě, pokud vůbec

POUŽITÍ VHODNÝCH ASEPTICKÝCH POSTUPŮ

Aseptické postupy jsou navrženy k zajištění bariéry mezi mikroorganismy z prostředí a Vaší kulturou, sterilním vybavením a chemikáliemi, které používáte pro práci s nimi. Existuje množství úspěšných postupů, jak dosáhnout a udržet buněčné kultury aseptické; nakonec je Váš postup „vhodný“, pokud před kontaminací rutinně chrání Vás i Vaše kultury. Výuka aseptických postupů je mimo rámec této příručky; cílem této příručky je shrnout některé základní zásady a uvést některé zlepšovací návrhy. Pro základní úvod do této velmi důležité oblasti odkazujeme čtenáře na Freshney[3].

Prvním krokem při vývoji zdravých, racionálních aseptických postupů je dobré porozumění vlastnostem biologické kontaminace a jejím potenciálním zdrojům. To je vyhodnoceno na začátku této příručky a podpořeno množstvím referencí.

Druhým krokem, založeným na typu Vaší práce, je určit míry rizika nebo nebezpečí pro Vás a další laboratorní personál a podle toho navrhnout Vaše kultivační postupy. To platí především při práci s virově kontaminovanými kulturami, nebo s kulturami odvozenými od lidí nebo primátů. Ujistěte se, že je veškerý laboratorní personál vyškolený v bezpečném zacházení a likvidaci jakéhokoliv potenciálně rizikového materiálu a kultur; v případě nutnosti asistence nebo pomoci se domluvte s oddělením bezpečnosti práce Vaší organizace/zařízení.[9]

Dále na základě potenciálních nákladů a následků ztráty kultury určete, jak přísné musí Vaše postupy být a jaký stupeň volnosti, pokud vůbec, je potřeba. S velmi cennými nebo nenahraditelnými kulturami mohou pracovat dva nebo více pracovníků s použitím médií z rozdílných zdrojů a samostatných inkubátorů ke snížení šance na simultánní ztrátu.[27, 28] Pracovníci by měli nosit při práci s kulturami čisté rukavice a pravidelně je měnit jako prevenci křížové kontaminace. Zhodnoťte, zda potřebujete další laboratorní oděv nebo obličejovou masku ke snížení možnosti kontaminace. Vaše pracovní prostředí a všechny problémy, které se mohou objevit, musí být také v souladu s vybranými aseptickými postupy. Certifikované boxy s laminárním prouděním vzduchu a bezpečnostní boxy jsou doporučeny k použití kdykoliv je to možné. Některé aseptické postupy vyučované v úvodních mikrobiologických kurzech a určené k použití na otevřených laboratorních stolech, například kahany, ač populární, nejsou vhodné nebo nezbytné v laminárních boxech.[16]

Ke snížení pravděpodobnosti kontaminace doporučujeme následující návrhy:

- Nošení rukavic minimalizuje šanci na kontaminaci Vašich buněčných kultur mikroorganismy.
- Udělejte pro mikroorganismy vniknutí obtížnější použitím uzavřených kultivačních nádob kdykoliv je to možné, především pro dlouhotrvající kultivace. Vícejamkové destičky mohou být uzavřeny lepicí páskou nebo umístěny do uzavíratelných sáčků, 35 a 60 mm misky mohou být umístěny do 150 nebo 245 mm misek. Použijte děrované uzávěry lahví (**obr. 6**) kdykoliv je to možné. Mají hydrofobní filtrační membránu, která umožňuje výměnu sterilních plynů, ale zamezuje průchodu mikroorganismů nebo kapalin.
- Vyvarujte se vylévání větších objemů média z kultivačních plochých lahví nebo sterilních lahví padesáti nebo stomililitrovými pipetami či aseptickými hadičkami. Použití jednorázových pipet a vakuových pump je ekonomicky nenáročná cesta k rychlému a bezpečnému odstranění média z kultury. Kapky média zůstávající v závitech nádob po vylití mohou vytvořit kapalné spojení při opětovném nasazení uzávěru a mohou umožnit vstup bakterií, kvasinek a plísní. Pokud se nelze vyhnout vylévání, opatrně odstraňte veškeré zbytky média z hrdla nádoby sterilní gázou nebo alkoholovým polštářkem.
- Vždy přenášejte neuzavřené kultury na tácech nebo v krabici, aby se minimalizoval kontakt se vzdušnou kontaminací. Plocha 245 mm misky je vhodná k přenášení 96- a 384-jamkových mikrodestiček, stejně jako 35 mm a 60 mm misek.
- Nepoužívejte laminární boxy jako skladovací prostory. Umístění nikoliv nezbytných krabiček, lahví, nádob atd. v boxu vede ke zvýšení biozátěže narušením správného proudění vzduchu.

- Nikdy nepipetujte ústy. Kromě rizika úrazu laboratorního personálu je pipetování ústy uváděno jako pravděpodobný zdroj lidských druhů mykoplazmy (M. orale a M. salivarium) často se vyskytujících v buněčných kulturách.[15]
- Noste čisté laboratorní pláště a další ochranné oděvy k ochraně proti kontaminaci z odlupující se kůže nebo civilního oblečení. Jejich nošení by mělo být vyžadováno v prostorách práce s kulturami k zamezení expozici špíně a prachu z jiných prostor.
- Pracujte pouze s jednou buněčnou linií naráz v jednom boxu a vždy používejte samostatné lahve médií, roztoky atd. pro každou kulturu, abyste zamezili křížové kontaminaci. Používejte dezinfekční prostředky k otření pracovního prostoru boxu mezi prací s různými buněčnými liniemi.
- Čistěte pravidelně vodní lázně používané k zahřívání médií a roztoků. Nejlépe se vyhněte vodním lázním úplně a používejte inkubační místnosti nebo lázně naplněné zahřátými kovovými nebo skleněnými kuličkami k zahřátí médií a roztoků. Namočení vnějšku lahve nebo kyvety do kontaminované vody před přemístěním do laminárního boxu není nikdy dobrý nápad.[17]
- Používejte média bez antibiotik k rutinní kultivaci; toto je velmi důležitý přístup a bude podrobněji rozebrán níže.
- Ke snížení pravděpodobnosti kontaminace vždy používejte špičky s filtrem, pokud užíváte na buněčnou kulturu jedno a multikanálové pipetory.
- Kdykoliv je to možné, uchovávejte sterilní roztok jako je trypsin, L-glutamin a antibiotika v malých objemech (např. v 15 mL zkumavkách) ke snížení počtu cyklů, kolikrát musí být každá zkumavka otevřena, a tedy i pravděpodobnosti kontaminace.

- Biologické bezpečnostní boxy a boxy s laminárním prouděním vzduchu by měly být zapnuty nejméně 15 minut před použitím každý den. Alternativně nechte laminární box v provozu 24 hodin denně během pracovního týdne. Pracovní plochy by měly být stírány 70% ethanolem nebo jinou vhodnou dezinfekcí,[44] před a po práci a mezi buněčnými liniemi.
- Nepoužívejte otevřený oheň, především Bunsenovy kahany, v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Je to nezbytné, může být kontraproduktivní a poškodit HEPA filtr. Americké Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) uvádí: „Otevřený oheň není nutný v téměř sterilním prostředí biologických bezpečnostních boxů. Otevřený oheň však v boxu vytváří turbulence, které narušují způsob, jakým je vzduch filtrovaný přes HEPA filtr dodáván k pracovnímu povrchu.“[61] Je to především bezpečnostní záležitost. Vážné exploze boxu, požáry a zranění jsou důsledkem úniku plynu z Bunsenových kahanů nebo zapálení alkoholu užívaného jako dezinfekce od otevřeného ohně.
- Dveře v kultivačních prostorách by měly být udržovány zavřené, pokud je laminární box v provozu. Otevření dveří může způsobit zpětný tah vzduchu a narušit laminární proudění v boxu. Zvažte nahrazení klasických dveří posuvnými k eliminaci tohoto problému, především ve vytížených prostorách.
- Minimalizujte pohyb osob kolem a blízko laminárních boxů během probíhající práce. Je zde zvýšená pravděpodobnost narušení proudění vzduchu, pokud se kolem pohybuje více osob, navíc může být pracovník snáze vyrušen a rozptýlen, pokud se účastní diskuzí s kolegy.

- Nepoužívejte germicidní ultrafialové (UV) záření k dezinfekci laminárních boxů: americký Národní institut zdraví (NIH), CDC, Národní vědecká nadace/Americký národní standardizační institut (NSF/ANSI) a Americká asociace biologické bezpečnosti se shodují v nedoporučení ultrafialových lamp, pokud nejsou nezbytné. NSF Standard 49, průmyslově testovaný standard pro všechny biohazard boxy, neposkytuje žádná kritéria pro UV záření a doslovně uvádí, že „UV záření není doporučeno v biohazard boxech Třídy II (s laminárním prouděním)“. Množství faktorů ovlivňuje účinnost germicidního efektu UV záření, které vyžaduje pravidelné čištění, údržbu a sledování k zajištění germicidního efektu. Navíc jsou zde bezpečnostní rizika spojená s expozicí UV záření, včetně popálení rohovky a rakoviny kůže.

[Odkazy 43, 45, 58; můžete se též podívat na Biosafety Technical Bulletin: Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets https://ncifrederick.cancer.gov/ehs/ibc/Media/Documents/UVLights.pdf].

SNIŽTE PŘÍLEŽITOSTI K NEHODÁM

Nehody vždy vyžadují lidi, a jejich snížení musí brát v úvahu lidskou přirozenost a stres. K nehodám nejčastěji dochází:

- v pátek odpoledne,
- den před začátkem dovolené,
- s novými zaměstnanci,
- když jsou lidé ve stresu, přepracovaní nebo spěchají.

Následující návrhy mohou pomoci snížit zmatky a nepochopení, které způsobují mnoho nehod a omylů v laboratoři.

- Buďte velmi opatrní při označování roztoků, kultur atd. Vždy jasně vyznačte, zda byl roztok nebo jiná chemikálie sterilizována. Snižte zmatky v přeplněných nebo vytížených laboratořích použitím barevného značení: přiřaďte každému pracovníkovi vlastní barvu pro označování pomocí štítků a fixů.
- Buďte velmi opatrní při použití a výběru akronym. Každý v laboratoři by jim měl rozumět a vědět, co znamenají.
- Používejte standardizované formuláře pro vedení záznamů, kdykoliv je to možné; zjednodušuje to jejich používání a zvyšuje pravděpodobnost jejich dobrého vedení.
- Používejte psané protokoly a tabulky složení při přípravě médií a roztoků, seznamy používaných chemikálií, čísla šarží, navážky, objemy, pH a dalších speciálních úprav, které byly provedeny. To sníží množství příležitostí pro vznik chyb, stejně jako poskytne cennou pomoc při hledání příčiny problému.

ČIŠTĚNÍ PRACOVNÍHO PROSTORU A JEHO OKOLÍ

Snížení množství vzdušných částic a aerosolů v laboratoři, především v okolí inkubátoru a boxu s laminárním prouděním, sníží množství kontaminací. Rutinně stírejte podlahy a pracovní povrchy ke snížení prachu. Inkubátory, především ty udržující vysokou úroveň vlhkosti, vyžadují pravidelné čištění a dezinfekci. Často přehlíženým, avšak důležitým zdrojem kontaminace, jsou vodní lázně používané k rozmrazování sér a zahřívání médií. Špinavé vodní lázně nejen pokrývají lahve vrstvou vysoce kontaminované vody právě předtím, než jsou umístěny do boxu, ale voda kapající z lahví vytváří vysoce kontaminovaný aerosol, který může skončit na laboratorních pláštích a rukách. Vodní lázně by měly být vypouštěny a čištěny na pravidelné bázi, a to ještě předtím, než se objeví zápach nebo zakalení. Odhazovací nádoby na pipety či špičky a jiné odpadní nádoby jsou zdrojem potenciálně vysoce kontaminovaných materiálů v blízkosti laminárního boxu a jsou také potenciálním zdrojem mykoplasmy.[26] Odpadní nádoby by měly být vyprazdňovány denně a odpad odstraňován bezpečně. Doporučujeme autoklávování veškerého materiálu, který byl v kontaktu s buňkami.

Chladící spirály chladniček a mrazáků jsou hlavním zdrojem vzdušných částic s mikrobiální kontaminací, což je často přehlíženo i v jinak velmi čistých laboratořích. Měly by být vysávány nejméně jednou ročně. Kromě odstranění významného zdroje kontaminace navíc pravidelné vysávání a čištění prodlouží životnost chladících jednotek a umožní jim pracovat efektivněji.

Mokrý led může být zdrojem kontaminace v laminárním boxu. Pokud je to možné, použijte alternativní metody chlazení.

Některé laboratoře mohou též potřebovat zvážit program managementu škůdců ke snížení přítomnosti myší, mravenců, švábů a dalších mnohonohých tvorů, kteří mohou být zdrojem kontaminace. Rostliny v květináčích, jakkoliv krásné, mohou poskytovat domov těmto tvorům a neměly by být umístěny v blízkém sousedství kultur. Při použití pesticidů jako součásti programu likvidace škůdců je třeba opatrnosti, aby nedošlo k nechtěné chemické kontaminaci kultur v laboratoři.

TESTOVÁNÍ

STERILITY

Nejlepší strategií ke snížení kontaminace je být proaktivní a rutinně sledovat chemikálie, média a roztoky, pracovní prostory, a to nejdůležitější – buněčné kultury – z hlediska kontaminace ještě předtím, než jsou použity v zásadních aplikacích a experimentech. Klíčem k vytvoření reálného programu sledování kontaminace je mít jej co nejjednodušší, aby ho lidé používali, a zároveň dobře plnil svou funkci. Bohužel neexistují jednoduchá řešení: žádné mikrobiologické médium nedokáže samo detekovat všechny typy biologické kontaminace a praktické testovací metody často neodhalí nízké úrovně kontaminace. Proces detekce je často ještě ztížen přítomností antibiotik. Postupy a koncepty popsané níže nabízí některé praktické přístupy pro sledování kontaminace, které mohou být snadno přizpůsobeny k pokrytí potřeb většiny laboratoří buněčné kultivace.

Všechny autoklávy a suché sterilizátory používané ke sterilizaci laboratorního skla, roztoků a jiných látek musí být pravidelně udržovány a personál náležitě školen v jejich plnění a provozu. Teploměry a záznamová zařízení by měla být pravidelně testována a kalibrována k zajištění jejich přesnosti. Levné (v porovnání s cenou selhání autoklávu) autoklávové teploměry, testovací proužky nebo kapsle se sporami, nebo jiná testovací zařízení mohou být umístěna do autoklávu nebo lahví s roztoky či jinak balených látek během každého spuštění, nebo podle potřeby k ověření správného plnění a provozu.

Vzorky všech v laboratoři připravených roztoků sterilizovaných filtrací by měly být testovány na sterilitu vždy, když jsou připraveny, a roztoky by neměly být používány, dokud není testování kompletní. Standardní mikrobiologické testovací metody pro bakterie, kvasinky a plísně většinou vyžadují umístit vzorky do/na několik různých médií (např. tryptic soy, thioglykolát, Sabouraudův bujón) a polotuhá média (brain-heart infusion, krevní agar) a poté je inkubovat při 30 °C a 37 °C nejméně dva týdny.[29]

Média pro buněčnou kultivaci, především neotevřené lahve média s propadlou expirací nebo déle nepoužívané v laboratoři (v případě, že neobsahují antibiotika) mohou sloužit jako velmi bohatá, snadno dostupná a užitečná náhrada standardních mikrobiologických médií. Malé množství séra (od 3 % do 5 % – opět mohou být použita expirovaná nebo nepotřebná séra) může být přidáno k podpoře růstu. Médium může být rozděleno po 10 mL do sterilních 16×125 mm skleněných nebo plastových zkumavek se šroubovacím uzávěrem nebo do čistých 15 mL plastových centrifugačních zkumavek a uloženo při 4 °C, dokud nebude třeba. Sterilita filtrovaných roztoků nebo kultur a látek podezřelých z kontaminace může být běžně a snadno zkontrolována umístěním malého vzorku do dvou zkumavek a inkubace jedné při 30 °C a druhé při 37 °C nejméně dva týdny.

Tento test sterility s náhradou médií je též velmi užitečný pro zhodnocení množství nebo zdrojů kontaminace částicemi v prostorách, částí nebo kusů vybavení nebo postupů. Boxy, a především inkubátory, jsou často označovány laboratorním personálem jako zdroj jejich problémů s kontaminací ve stylu „moje kultura je pořád kontaminovaná, protože je něco špatně v boxu“ (nebo inkubátoru). Dokud jsou tyto prostory vnímány a označovány jako zdroj problémů, ten opravdový problém, často jednoduše špatné aseptické postupy, nemůže být efektivně vyřešen. Podezřelé problematické prostory mohou být prozkoumány rozpipetováním testovacího média do 96-jamkových mikrodestiček nebo 100 mm kultivačních misek (použijte do nich média s agarem). Nádoby pak (s uzavřenými nádobami jako kontrolou) otevřete na 30 až 60 minut na různých částech testovaného místa před uzavřením a inkubací. Kultury mohou být nejprve zkontrolovány na kontaminaci po dvou až třech dnech, ačkoliv pomalu rostoucí kontaminanty se mohou objevit až po dvou či více týdnech. Úroveň kontaminace (počet kolonií nebo kontaminovaných jamek/nádob nebo jednotky plochy/jednotky času) může být spočtena a analyzována. Kromě zjištění přesné úrovně biologického zatížení prostor může mikroskopické pozorování kontaminant v kapalném testovacím médiu též umožnit morfologické srovnání s mikroorganismy nalezenými a působícími problémy v buněčných kulturách. Dřívější zkušenosti s tímto přístupem ukázaly, že jde o velmi vhodný nástroj k výuce aseptických postupů, jelikož jasně demonstruje, že vzduch v místnostech nebo uvnitř vlhkého inkubátoru většinou není hlavním zdrojem kontaminace v dobře udržované laboratoři. Tato metoda je vhodná také pro vysledování záhadných epidemií kontaminace.

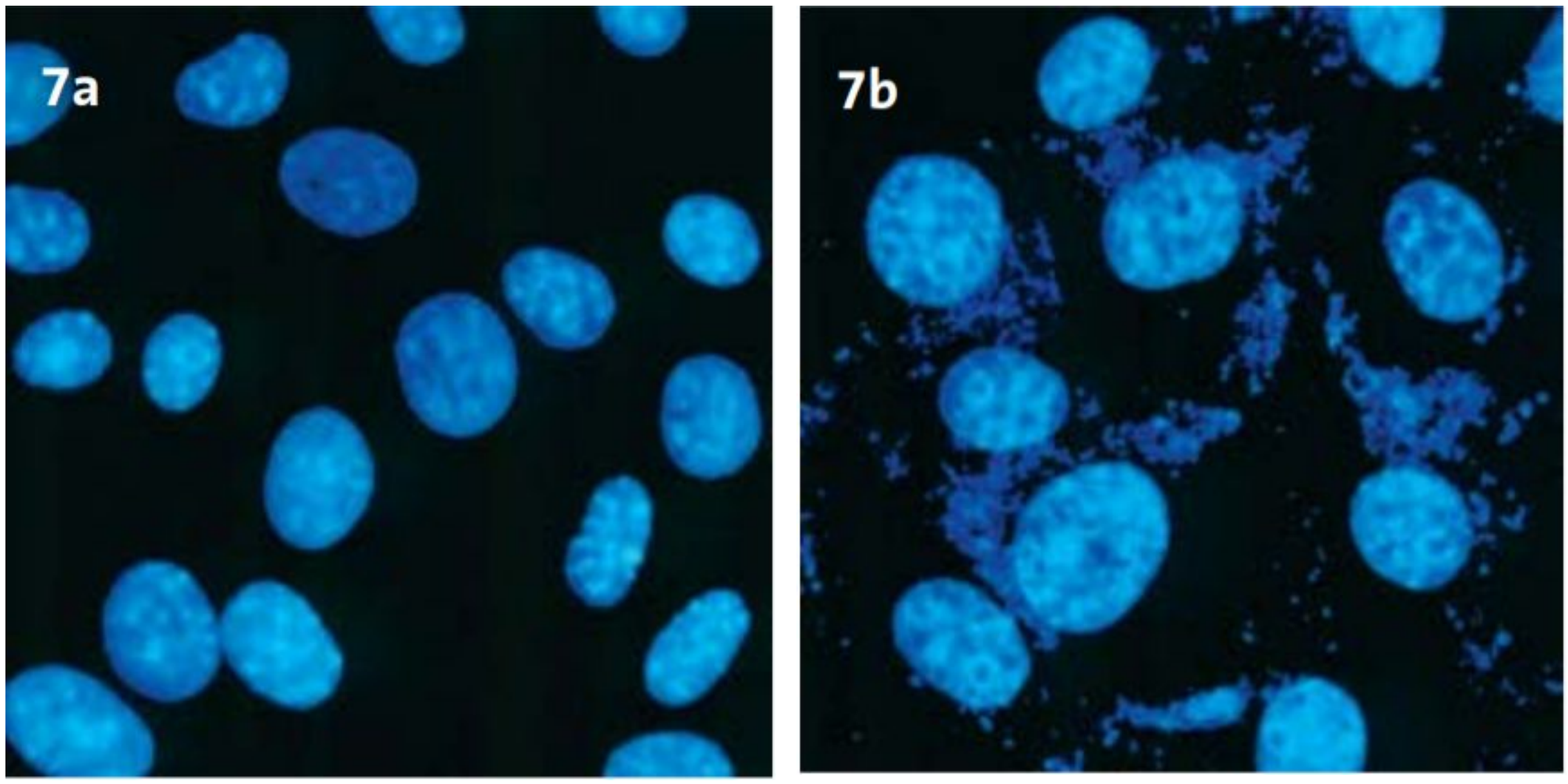
DETEKCE MYKOPLAZMY V KULTURÁCH

Žádný sledovací program není kompletní, pokud nedokáže efektivně detekovat kontaminované kultury, především ty infikované mykoplazmou. Bohužel detekce mykoplazmy není jednoduchá, a díky tomu a chybějícímu povědomí se mnoho uživatelů buněčných kultur neobtěžuje s testováním – až 50 % (**viz výsledky průzkumu kontaminace na stránkách 53 a 54**). Ve výsledku se odhaduje, že nejméně 15 % všech buněčných kultur ve Spojených státech je kontaminováno mykoplazmou. Z důvodů takto ostudně vysoké úrovně kontaminace a prokázané lehkosti, s níž se může mykoplazma šířit z kontaminovaných kultur,[26] je důležité dát do karantény všechny kultury přicházející do laboratoře, dokud nejsou otestovány na mykoplazmu. To je realita především u darovaných buněčných linií z jiných laboratoří; často tyto bezplatné „dary“ končí infekcí Vašich kultur a následnými problémy.

Existují dvě základní testovací metody na mykoplazmu: přímá kultivace v médiu nebo nepřímé testy měřící specifické vlastnosti mykoplazmy.[16] Přímá kultivace je nejefektivnější a citlivá metoda pro detekci mykoplazmy, je však též obtížná a časově náročná. Vyžaduje několik pečlivě testovaných kapalin a polotuhých médií a řízené prostředí (detailní protokoly v referenci 30), a musí být provedena s živou mykoplazmovou kontrolou. Navíc, ačkoliv je přímá kultivace nejcitlivější metodou, je nejpomalejší (vyžaduje přes 28 dní) a nemusí spolehlivě odhalit některé citlivější kmeny mykoplazmy, což ji činí méně než 100% efektivní. Pokud to rozpočet dovoluje, testování přímou kultivací je lepší vyjednat v jiném testovacím zařízení, a to ze dvou důvodů: první je dán lehkostí, s jakou se může mykoplazma šířit v laboratoři; nedoporučuje se přinést živé mykoplazmy do kultivačních prostor jako nutnou kontrolu; druhým důvodem je, že aby bylo přímé testování děláno správně, vyžaduje významné úsilí a zdroje, které by byly lépe využity v buněčné kultivaci jako takové. Tato testování jsou komerčně dostupná za rozumnou cenu u několika společností testujících buněčné kultury. (Pro další informace o službách testování mykoplazmy navštivte www.atcc.org nebo www.bionique.com).

Existuje široká škála dostupných nepřímých testovacích metod k detekci mykoplazmy, včetně PCR souprav, fluorochromového barvení DNA, autoradiografie, ELISA, imunofluorescence a specifických biochemických rozborů. Tyto testy jsou rychlejší než přímá kultivace, všechny jsou komerčně dostupné ve formě souprav a mohou detekovat citlivé, obtížně kultivovatelné kmeny, které někdy zůstávají přímou kultivací neodhaleny. Nicméně tradičně postrádají citlivost přímé kultivace a vyžadují vyšší úroveň kontaminace k detekci. Ve výsledku podávají častěji falešně negativní výsledky než přímé kultivační metody, potenciálně tak nechávají vědce, kteří spoléhají pouze na jeden nepřímý test, ve falešném pocitu bezpečí.[shrnuto v 11, 12, 18, 35, 51]

Široce užívanou a vysoce doporučovanou metodou nepřímého testování je fluorochromové barvení DNA.[31, 47] Tato jednoduchá a relativně rychlá procedura barví DNA pomocí fluorescentní barvy. Když jsou obarvené a fixované buňky zkoumány pod UV mikroskopem vybaveným odpovídající sadou filtrů, DNA svítí jasně (**obr. 7a a 7b**). Tento test nejen, že může odhalit mykoplazmu, ale jako přidaný benefit může také detekovat další mikrobiální kontaminanty. Tato barvící technika může být kombinována s indikátorovou buněčnou linií ke zvýšení citlivosti. Interpretace výsledků není vždy snadná, především s hybridomovými kulturami; vhodné pozitivní a negativní kontrolní snímky mohou vždy sloužit k pomoci s interpretací výsledků barvení. Tyto pozitivní a negativní mykoplazmové kontrolní snímky jsou komerčně dostupné; od jejich zafixování je bezpečné je použít v laboratoři.



Obrázek 7a a 7b: *Mikrofotografie (1 000x) VERO buněk, barveno barvou Hoechst 33258. Jádra a mykoplazmy obsahující DNA se zbarvují pod ultrafialovým světlem, což umožňuje snadněji rozlišit čistou kulturu (7a) od infikované (7b). Mikrosnímek byl poskytnut Bionique Testing Laboratories, Inc.*

Nedávný rozvoj a vylepšení PCR metod značně rozšířil možnosti testování v rámci kontroly kvality buněčných linií a některých terapeutik založených na buňkách. Tyto vylepšené metody jsou citlivější než barvení DNA fluorochromem a další nepřímé metody. V některých případech nabízí srovnatelnou efektivitu detekce jako kultivační metody. Nejsou ale schopné rozlišit mezi DNA životaschopných a uhynulých organismů, což může způsobovat falešně pozitivní výsledky. Nesprávné výsledky mohou být též výsledkem kontaminací PCR amplikonu pocházejícího z prostředí a přenosu amplikonů z dřívějších PCR běhů, nebo interferencí ze složek v médiu nebo z buněk. V důsledku toho je nezbytné, aby se laboratoře používající PCR věnovaly otázce kontroly plánování v rámci zařízení, návaznosti procesů a vývoje striktních postupů.[17]

Nejlepším souhrnným testovacím přístupem je kombinace obou metod: přímá kultivace může zajistit velmi vysokou citlivost, zatímco barvení DNA fluorochromem může detekovat růstově náročné mykoplazmy, které přímá kultivace neodhalí. FDA a USDA vyžadují tento přístup pro produkty odvozené od buněčných kultur, jako jsou monoklonální protilátky, vakcíny a léčiva, k jejichž produkci jsou potřeba buňky. Pokud zdroje nedovolují kombinovaný přístup, pak může přinést dostačující úroveň bezpečnosti pro většinu výzkumných aplikací metoda barvení DNA fluorochromem využívající indikační buněčnou linii, kombinovaná s jednou další nepřímou testovací metodou.

Z důvodů velmi závažné povahy kontaminace mykoplazmou a jejího širokého rozšíření je důležité si shrnout hlavní zdroje kontaminace mykoplazmou a základní kroky její prevence ve Vaší laboratoři:

1. V současnosti je u kontaminace mykoplazmou zdrojem číslo jedna jiná infikovaná buněčná linie; je zásadní umístit do karantény všechny kultury přinesené do laboratoře dokud nejsou prověřeny na kontaminaci mykoplazmou a ve výzkumu používat pouze testované kultury.
2. Druhým běžným zdrojem je kultivátor buněk; dobré zaškolení především v aseptických technikách kombinované se strategickým použitím ukládání testovaných buněk a limitovaným použitím antibiotik do velké míry sníží příležitosti pro kontaminaci touto cestou.
3. Posledním důležitým zdrojem mykoplazmy jsou séra a jiné biologické materiály, které jsou sterilizovány filtrací; naštěstí díky lepším filtračním postupům a testovacím metodám byly problémy z této oblasti významně sníženy.[54] Přesto ale nakupujte pouze ze zdrojů s dobrou reputací, které používají spolehlivou, vhodnou filtraci (0,1 µm nebo menší) a testovací procedury.

DETEKCE JINÝCH BIOLOGICKÝCH KONTAMINACÍ V KULTUŘE

Tradiční mikrobiologická média pro testování sterility roztoků popsaná dříve mohou být upravena k testování kultur na bakterie, kvasinky a plísně.[29] Avšak přímé kultivační testování a nepřímý DNA fluorochromový test na mykoplazmu, ač nenavržen k tomuto účelu, též detekuje většinu bakterií, kvasinek a plísní, a to včetně intracelulárních forem, což snižuje potřebu tradičních testů. Speciální kultivační postupy jsou též dostupné pro detekci prvokové kontaminace v kultuře.[32]

Je několik dalších důležitých testů kontroly kvality, které by měly být provedeny k identifikaci a charakterizaci buněčných kultur ve Vašem výzkumu. Velmi vážný je široce rozšířený problém křížové kontaminace jinými buněčnými liniemi popsaný dříve, ale buňky se též kontinuálně vyvíjejí v kultuře: důležité vlastnosti mohou být ztraceny, mohou se objevit mutace, nebo mohou chromozomy změnit uspořádání či změnit počet. Sledování těchto změn je důležité, jelikož změněné buněčné kultury mohou mít významný dopad na reprodukovatelnost Vašeho výzkumu.[shrnuto v 33] Následující metody charakterizace jsou doporučeny pro sledování identity buněčných linií; detaily najdete v citovaných studiích. Většina laboratoří by měla začlenit nejméně jednu z těchto metod jako součást svého monitorovacího programu.[shrnuto v 52]

- Chromozomální analýza/karyotypizace, relativně jednoduchá metoda zahrnující přípravu rozprostření metafáze s vazbou a barvením chromozomů k určení modálního počtu chromozomů a přítomnosti unikátních markerových chromozomů.[34]
- Isoenzymová analýza používající elektroforézu k vytvoření proteinového „fingerprintu“, který může být využit pro určení druhu nebo budoucí srovnávání.[33] Toto byla metoda původně použitá Gartlerem v šedesátých letech k ukázání křížové kontaminace lidských buněčných linií HeLa buňkami.[19, 20]
- Imunologické nebo biochemické techniky k detekci markerů, které jsou unikátní pro tkáň, buněčnou linii nebo druh, ze kterého je linie odvozena.[33]

- DNA fingerprinting, měření variabilní délky uvnitř minisatelitní DNA obsahující variabilní počet tandemových repetitivních sekvencí (VNTR) k detekci vnitro- a mezidruhové kontaminace.[35]
- Analýza amplifikovaných fragmentů specifických genů nebo skupin genů z polymerázové řetězové reakce (PCR).
- DNA „barcode“ oblasti lze potvrdit sekvenací DNA fragmentů z mitochondriálního genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy.
- Profily krátkých tandemových repeticí (STR) detekující variace v délce mikrosatelitní DNA obsahující variabilní počet tandemových repetitivních sekvencí. Tato metoda se v současnosti stala mezinárodním referenčním standardem a je vysoce doporučována jako jednoduchý a ekonomický přístup k potvrzení identity buněčných linií. Tyto testy jsou též komerčně dostupné za velmi rozumné ceny.

Výsledky z těchto identifikačních testů mohou sloužit jako důležitá reference, se kterou mohou být srovnány budoucí změny.

DOPORUČENÍ PRO TESTOVACÍ PROGRAM PRO BUNĚČNÉ KULTURY

Testovací program pro buněčné kultury, který jste si vybrali, by měl být ten nejlepší, jaký si můžete dovolit. Jde totiž o základní kámen Vašeho výzkumu, a tedy dobře utracené peníze. Nedostatečný program (nebo hůře žádný program) vytváří falešný pocit bezpečí a nakonec může vést k selhání, které kompromituje validitu Vašeho výzkumu. Následující kroky jsou doporučeny k nastavení rozumného a praktického monitorovacího programu kultur:

1. Otestujte všechny buněčné linie, které nyní máte, s použitím některé z metod popsaných výše, abyste se ujistili, že neobsahují mykoplazmu a jinou biologickou kontaminaci, a také pro kontrolu jejich identity. Pak tyto testované kultury začleňte do Vaší buněčné sbírky/úložiště a při všech budoucích experimentech vycházejte pouze z nich.
2. Umístěte do karantény a pak otestujte všechny příchozí buněčné linie a všechny kultury nyní skladované ve Vašem úložišti buněk, které nebyly otestovány před zamražením.
3. Testujte všechny buněčné linie, které jsou nepřetržitě používány, nejméně každé tři nebo čtyři měsíce a kdykoliv, když se začnou chovat podezřele. Ještě lepší periodicky tyto kultury vyhazovat a nahrazovat je kulturami z Vašeho testovaného úložiště buněk, což šetří čas, peníze a práci. (Tato strategie bude detailně diskutována dále v sekci o používání úložišť buněk.)
4. Nové šarže séra by měly být prověřeny pro zásadní aplikace před širším použitím. Nejjednodušší testovací metoda je používat nové sérum v indikátorové buněčné kultuře po několik týdnů a otestovat kulturu na kontaminaci mykoplazmou pomocí barvení DNA nebo jiného vhodného testu.

DETEKCE CHEMICKÉ KONTAMINACE

Zjištění, že původcem problémů s buněčnou kulturou je chemická kontaminace, je většinou mnohem obtížnější než u biologické kontaminace, jelikož je těžší ji odhalit. Často jsou první známky toho, že je něco špatně, změny v růstu, vlastnostech nebo morfologii napříč kulturami v laboratoři; nicméně může trvat týdny, než si těchto změn všimnete. Jakmile jsou zaznamenány, zdroj je často chybně určen jako biologického původu; pouze po rozsáhlém a neúspěšném testování na běžné mikrobiální původce se pozornost zaměří na možnost chemické kontaminace.

Začátek procesu řešení problému je identifikace všech změn, které se vyskytly v laboratoři v týdnech před zaznamenáním problému, především ve vybavení, roztocích, médiích a chemikáliích, které by mohly být spojeny s problémem.[2] Dobré vedení záznamů je pro úspěšnost tohoto procesu zásadní. Sezvěte laboratorní personál k hromadnému brainstormingu ohledně všech možných příčin, a pak vyberte nejlepší možnosti k prověření. Jednoduché srovnávací experimenty mohou být provedeny k vyloučení každého možného zdroje problémů: média, roztoky, séra a další produkty používané jako kontroly během testování mohou být získány z jiných laboratoří nebo zdrojů. Nejlepší cesta, jak se vyhnout chemické kontaminaci, je testovat všechny nové šarže reagencií, médií a především sér, a testovat čistotu vody nejméně jednou ročně s použitím nejcitlivějších dostupných kultivačních rozborů.

STRATEGICKÉ POUŽITÍ ÚLOŽIŠTĚ ZMRAZENÝCH BUNĚK

Úložiště kryogenních buněk je v laboratořích běžně používáno ke snížení potřeby práce s velkým množstvím kultur a k náhradě kultur ztracených v důsledku kontaminace nebo nehod. Mrazení kultur též zastavuje jejich biologické hodiny, což je chrání před objevením změn ve vlastnostech, což se může běžně stát u aktivně rostoucích buněk jako následek vlivu prostředí nebo stárnutí. Nicméně úložiště buněk je jediná spolehlivá zásobárna, pokud byly kultury, které obsahuje, řádně testovány, označeny a uloženy.[shrnuto v 36, 44]

Stejně tak důležité je, že úložiště buněk lze strategicky používat k převedení buněk, se kterými se kontinuálně pracuje, na sérii krátkodobě používaných kultur, čímž se výrazně sníží množství požadovaných testů kvality a zároveň potenciální problém se skrytou kontaminací.[shrnuto v 53] Pokud jsou kultury v laboratoři nepřetržitě používány po dlouhou dobu, měly by být testovány na kontaminaci nejméně každé tři až čtyři měsíce (pro důležité aplikace častěji). Pokud nejsou testovány pravidelně, pak v případě, kdy je skrytá kontaminace jako je mykoplazma nebo jiná buněčná linie konečně objevena, je nemožné určit, jak dlouho se v kultuře nachází a kolik výzkumů bylo znehodnoceno její přítomností. Pokud je navíc kontaminací mykoplazma, pravděpodobně se rozšířila i do dalších kultur. Na druhou stranu pravidelné testování, třebaže velmi důležité pro zachování integrity Vašich kultur, může vyžadovat značné úsilí, především pokud se v laboratoři pracuje s více kulturami. Spíše, než testovat kultury několikrát za rok, je snazší je jednoduše zlikvidovat každé tři měsíce a nahradit je z úložiště kulturou stejné šarže nebo várky, která byla předtím testována k ověření její integrity.

Testované zásoby buněk by měly být připraveny v úložišti buněk pro každou kulturu běžně používanou ve Vaší laboratoři. Kultury by měly růst po nejméně dva týdny v médiu bez antibiotik a poté důkladně otestovány k ověření jejich životaschopnosti, že neobsahují kontaminanty a k ověření jejich identity a přítomnosti důležitých vlastností. Testovány by měly být bezprostředně před i po zamražení; nicméně pokud nepředpokládáte nějaká další rizika, mohou být testovány až po zamražení.

Zamražené zásoby buněk by měly být vždy připraveny ze shromážděných kultur a měly by obsahovat dostatek vialek, za předpokladu spotřeby kolem pěti vialek za rok (nebo vyšší v závislosti na Vaší zkušenosti), aby vydržely do konce plánovaného trvání všech projektů, které je vyžadují. Lepší alternativou může být nejprve vytvořit hlavní zásobu (10 až 20 vialek by mělo být dostatečné, záleží na Vašich předpokládaných potřebách) a z ní poté tvořit pracovní zásoby (kolem 20 vialek). Jakmile je pracovní zásoba spotřebována, je nahrazena použitím vialky z hlavní zásoby k vytvoření nové pracovní zásoby. V případě spotřeby kolem pěti vialek za rok by měla každá pracovní zásoba vydržet asi 4 roky, s hlavní zásobou na 40 až 80 let. Doufejme, že to bude dost dlouho na dokončení výzkumného projektu. Tento přístup snižuje množství pravidelných testů na praktickou úroveň, kdy budou vyžadovat testování pouze nově zaváděné kultury. Stejně tak důležitým bodem je, že likvidace kultur po tříměsíčním růstu též zničí veškerou neodhalenou biologickou kontaminaci, která mohla proniknout do kultury, a omezuje její možnost poškodit integritu výsledků výzkumu a její šíření do dalších kultur.[53]

STRATEGICKÉ POUŽITÍ ANTIBIOTIK

Pokud jsou používány s rozmyslem, jsou antibiotika užitečným nástrojem v buněčné kultivaci. Mohou však být velmi nebezpečná, pokud jsou nadužívána nebo užívána nesprávně. Zkušení uživatelé buněčných kultur doporučují již mnoho let, aby antibiotika nikdy nebyla pravidelně užívána v kultivačních médiích.[3, 7, 12, 17, 18, 26, 27, 49] V hlavní studii uvádí Barile, že 72 % kultur rostoucích nepřetržitě pod antibiotiky bylo kontaminováno mykoplazmou, ale pouze 7 % rostoucích bez antibiotik bylo kontaminováno, což je desetinásobný rozdíl.[37] Podobné výsledky jsou obvyklé: pracovníci, kteří běžně a nepřetržitě používají antibiotika v médiu, mají tendenci k větším problémům s kontaminací, včetně kontaminace mykoplazmou, než pracovníci, kteří antibiotika nepoužívají. Přehnané spoléhání se na antibiotika vede k nedostatečným aseptickým postupům. Vede to také ke zvýšené rezistenci k antibiotikům napříč běžnými kontaminacemi kultur. V jedné probíhající studii[41] citlivosti k antibiotikům u mykoplazem z kultur bylo 80 % rezistentních ke gentamycinu, 98 % k erythromycinu a 73 % ke kanamycinu, tedy běžně užívaným antibiotikům, která jsou považována za efektivní proti mykoplazmám. Mykoplazmy též vykazovaly rezistenci k antibiotikům doporučovaným a prodávaným specificky pro vyčištění kultur infikovaných mykoplazmou: 15 % bylo rezistentních k ciprofloxacinu, 28 % k linkomycinu a 21 % k tylosinu.

Proč vede rutinní používání antibiotik k vyšší míře kontaminace mykoplazmou?[podrobněji v 50] Při práci v laboratoři každý vytváří a ztrácí relativně konstantní množství částic tvořených vlákny, aerosoly a kapénkami. Tyto částice mohou obsahovat mix bakterií, kvasinek, plísní a též i na ně vázané mykoplazmy. Pokud jedna z těchto částic nesoucích kontaminaci pronikne do kultury bez antibiotik, je pravděpodobné, že alespoň jedna z kontaminant vytvoří výrazně viditelnou infekci během 24 až 48 hodin. Ve výsledku je kontaminace rychle detekována a kultura zlikvidována. Je velmi nepravděpodobné, že by částice vytvářené laboratorním personálem obsahovaly pouze obtížně zjistitelné kontaminanty, jako jsou mykoplazmy, které by vstoupily do kultury a nezpůsobily viditelné známky kontaminace. Nicméně pokud kultura obsahuje antibiotika, je zde šance, že antibiotika zabrání růstu obvyklé, snáze detekovatelné kontaminace a umožní mykoplazmě či jiné skryté kontaminantě nepozorovaný růst. V důsledku je tak místo likvidace skrytě infikovaná kultura stále používána, začleňována do experimentů a stává se potenciálním zdrojem vážné kontaminace pro ostatní kultury v laboratoři.

Antibiotika by nikdy neměla být používána jako náhrada za dobré aseptické postupy; na druhou stranu mohou být používána strategicky ke snížení rizika ztráty kritických experimentů a kultur. Klíčem je používat je pouze pro krátkodobé aplikace: po dobu jednoho nebo dvou týdnů pro primární kultury, v průběhu počátečních fází produkce hybridomů, obecně pro experimenty, kde bude na konci kultura zničena. Bez ohledu na použití by měla být nakonec vybrána antibiotika účinná, necytotoxická a stabilní.[37, 50]

NÁPRAVA KONTAMINOVANÉ KULTURY

Autoklávování je preferovaná metoda naložení s kontaminovanými kulturami – vždy funguje a je zaručeno zabránění infekci v šíření do dalších kultur. Nicméně občas se kontaminace vyskytne v cenných kulturách, které nemohou být nahrazeny a bude snaha je zachránit. Jedná se o úkol, který nebude snadný, obvykle totiž vyžaduje značné úsilí a většinou končí neúspěchem.[17, 57] Navíc mohou v důsledku čistící procedury kultury ztratit důležité vlastnosti. Pokud jsou kontaminantami kvasinky nebo plísně, úspěch je nepravděpodobný, jelikož antifungální látky jako je amfotericin B (Fungizone) a Nystatin tyto organismy nezabíjí, ale pouze jim brání v růstu. Mnoho bakteriálních kontaminant kultur je lidského nebo zvířecího původu a často získávají rezistenci k většině antibiotik běžně užívaných v kulturách.

Avšak většina pokusů o vyčištění kultury probíhá u kultur infikovaných mykoplazmou. Léčba antibiotiky je nejrozšířenější přístup, ale jak již bylo uvedeno výše, kmeny mykoplazmy kontaminující kultury jsou často rezistentní k některým antibiotikům specificky doporučovaným k čištění mykoplazmou infikovaných kultur. Kromě toho, čím více pokusů o vyčištění kultury bude provedeno těmito antibiotiky, tím pravděpodobnější je vznik rezistentních kmenů mykoplazmy. Mohou být použity i jiné přístupy, obvykle kombinující použití antibiotik se specifickými antiséry nebo jinou chemickou léčbou.[diskutováno v 11, 16, 17, 37, 57] Nicméně žádná z těchto metod není 100% úspěšná a čištění by mělo být zkoušeno až jako poslední možnost.

Varování: Tyto léčebné metody často sníží úroveň kontaminace pod hladinu detekovatelnou nepřímými metodami, jako je barvení DNA nebo PCR. Ve výsledku se pak pokus o vyčištění jeví úspěšně prvních několik měsíců nebo déle dle léčby, jelikož malé množství přežívající mykoplazmy může uniknout detekci. Nakonec se však pár zbylých nedetekovatelných mykoplazem vzpamatuje, což povede k závažnějším problémům. Pokud to Váš rozpočet dovolí, existují komerčně dostupné služby odstranění mykoplazmy z kontaminovaných kultur, které jsou relativně drahé, ale většinou úspěšné.[17, 57]

ČÁST 4: Závěrečné varování

Je tomu více než 50 let, co byl Gartler dost odvážný, aby prezentoval svá zjištění o kontaminaci HeLa buněk na Second Decennial Review Conference on Cell Tissue and Organ Culture v Bedfordu v Pensylvánii.[19] Jeho práce ukázala, že prakticky všechny používané heteroploidní lidské buněčné linie byly vlastně kontaminovány HeLa buňkami. Bohužel byla jeho práce odmítnuta velkou částí vědecké komunity a tato HeLa kontaminace se šíří dodnes a je používána vědci po celém světě. Jenom ve Spojených státech stojí uživatele buněčných kultur každoročně ztráty způsobené kontaminací buněčných kultur, především široce rozšířenou HeLa linií, jinými buněčnými liniemi a mykoplazmou, stovky milionů dolarů; tyto peníze by jinak mohly být využity na další výzkumné projekty.[55]

Bohužel se nezdá, že by se tyto vážné problémy lepšily. Jak ukázaly výsledky průzkumu uvedené na stránce 53 a 54, kontaminace mykoplazmou je stále problémem pro většinu lidí pracujících s buněčnými kulturami. Nejméně 23 % respondentů má zkušenost s mykoplazmovou kontaminací své kultury a dalších 44 % má na mykoplazmovou kontaminaci podezření, ač si nejsou jistí. Důvod pro jejich nejistotu je osvětlen v odpovědi na otázku D) na stránce 54: 50 % všech respondentů netestuje na mykoplazmu; výsledkem je neznalost stavu jejich kultury. Odpověď na otázku E) poukazuje na jeden důležitý důvod pro rozšířené problémy s kontaminací – nadužívání antibiotik. Z 65 % respondentů užívajících antibiotika na běžné bázi je pravděpodobný pokračující častý výskyt skryté kontaminace, především mykoplazmy.

Více nedávných průzkumů ukázalo, že problémy křížové kontaminace buněk jsou též ignorovány množstvím výzkumníků. Buehring *et al.*[56] v roce 2004 reportovali, že pouze jedna třetina z 483 vědců z 48 zemí testovalo své buněčné linie k ověření jejich identity. Online průzkum z roku 2015[55] ukázal, že většina (52 %) z 446 vědců, kteří odpovídali, nikdy neprovedla ověření nebo jiné druhové testování kontroly kvality buněčných liniích používaných v jejich výzkumných programech. Některé časopisy konečně začaly vyžadovat průkaz autenticity buněčných linií ve všech zaslaných manuskriptech využívajících kontinuální buněčné linie. Doufejme, že to pomůže přimět vědce lépe se vypořádat s těmito problémy křížové kontaminace a chybné identifikace buněčných linií. Neexistují odůvodněné omluvy pro plýtvání cenným časem, penězi a zdroji při používání kontaminovaných buněčných linií ve výzkumu. Testujte všechny kultivované buňky, které používáte ve výzkumu, na mykoplazmu a ověřujte správnost jejich identity.[52] Sledujte literaturu, především seznamy kontaminovaných buněčných linií, které jsou k nalezení v národních sbírkách buněk jako jsou ATCC, DSMZ, ECAAC a JCRB, nebo v Databázi křížově kontaminovaných nebo chybně identifikovaných buněčných linií pod Mezinárodní komisí pro ověřování buněčných linií (International Cell Line Authentication Committee, ICLAC) (iclac.org/databases/cross-contaminations).

Výsledky průzkumu kontaminace:

A

Považujete mikrobiální kontaminaci (bakterie, kvasinky, plísně, mykoplazma) ve svých kulturách v současnosti za problém?

50 % – Ano, malý

8 % – Ano, závažný

33 % – Ne

9 % – Nejsem si jistý/á

B

Jak často máte tento problém?

67 % – 1-5x ročně

20 % – 6-10x ročně

12 % – Více než 10x ročně

C

Setkali jste se někdy ve své kultuře s kontaminací mykoplazmou?

9 % – Ano, jednou

14 % – Ano, několikrát

33 % – Nikdy

44 % – Možná, nejsem si jistý/á

D

Testujete pravidelně své kultury na přítomnost mykoplazmy?

50 % – Ne

32 % – Ano, občas

18 % – Ano, průměrně 4x ročně

E

Používáte antibiotika ve svém kultivačním médiu?

65 % – Ano, běžně

7 % – Ano, pouze krátkodobě

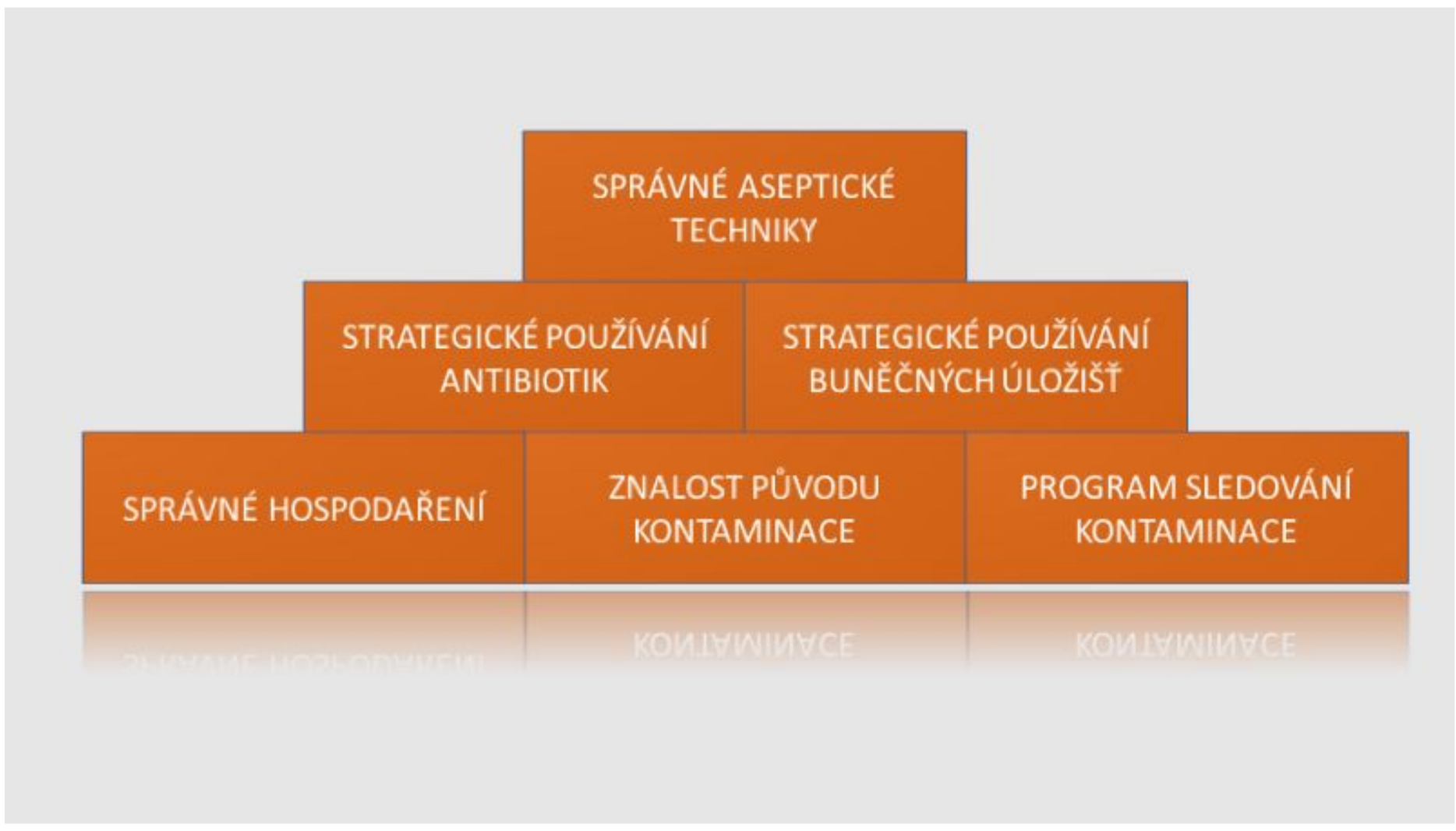
17 % – Příležitostně

11 % – Nikdy

**Kombinované výsledky tří průzkumů (130 respondentů) prováděných na seminářích Corning v Baltimoru, Bostonu a St. Louis v roce 1990.*

Kontaminace buněčných kultur nebude nikdy zcela vymýcena, ale s dobrým tréninkem[44, 49], lepší znalostí původu kontaminace a implementací několika základních přístupů ji lze lépe kontrolovat a výrazně snížit její dopady.

Informace v této příručce byly sestaveny za účelem poskytnout Vám základy (**tab. 2**), se kterými můžete vytvořit program kontroly kontaminace navržený tak, aby vyhovoval Vašim potřebám. Pro další pomoc v této problematice navštivte www.corning.com/lifesciences nebo kontaktujte Corning Scientific Support na 1.800.492.1110; mimo Spojené státy volejte +1.978.442.2200.



Tabulka 2: *Klíčové stavební kameny pro úspěšné zvládání a řízení kontaminace buněčných linií.*

Pro lepší přehlednost buněčných kultur ve Vaší laboratoři na další stránce najdete List k zápisu buněčné kultury.

Zápis buněčné kultury

Buněčná linie _____

Plný název _____

Zkratka _____

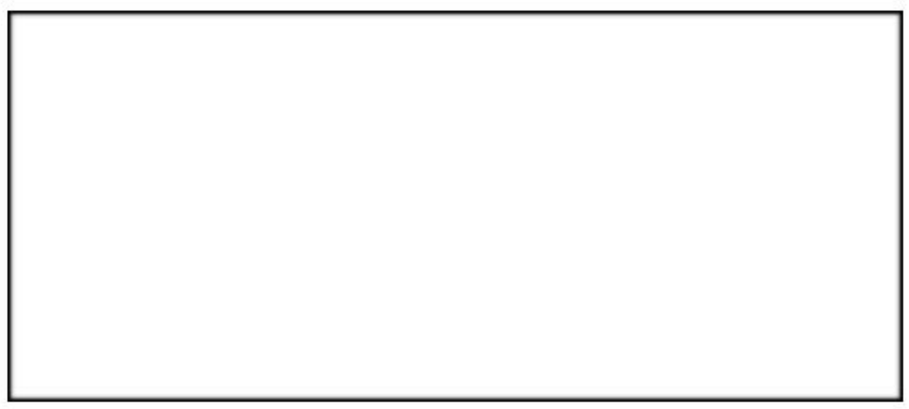
Datum obdržení _____

Od koho byla linie získána? _____

Morfologie zdravých buněk (popis nebo snímek)

Morfologie nemocných nebo stresovaných buněk (popis nebo snímek)

Může být docíleno snížením koncentrace séra o 75 % na 24 hod a následným popisem sledovaných změn v morfologii.



Je buněčná linie certifikována jako bez kontaminace? (Např. mykoplazma) ___ANO ___NE

Čas zdvojení (dělení) _____

___ přisedlých buněk ___ plovoucích buněk

Podmínky povrchu pro růst (TC-ošetřené nebo vyžadované speciální povrchy, specifikujte)

_____

Jedinečné vlastnosti (primární, konstruované ...)

_____

Médium užívané pro kulturu _____

FBS? ___ANO ___NE (Pokud ano, kolika % FBS?) _____

Glutamin _____

POZNÁMKY

Antibiotika ___ANO ___NE (pokud ano, která antibiotika?) _____

Další přidané látky

_____

Datum testování na mykoplazmu _____

Výsledek testování na mykoplazmu

_____

Byla kontaminace zjišťována před zamražením zdrojové kultury? ___ANO ___NE

Zamrazovací roztok _____

Počet zamrazených zdrojových kultur _____

Počet zamrazených pracovních kultur _____

Přijatelný rozsah pasážování _____

ČÁST 5: Literatura

1. Waymouth, C. Construction of Tissue Culture Media. Chapter 2 in Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture; G. H. Rothblat and V. J. Cristofalo, eds. (Academic Press, New York, 1972) 11-47.

2. Ryan, J. A. General Guide for Identifying and Correcting Common Cell Culture Growth and Attachment Problems. Corning Technical Bulletin at www.corning.com/lifesciences.

3. Freshney, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. (Alan R. Liss, New York, 1981) Chapters 5, 10, and 17.

4. Wang, R. J. Effect of Room Fluorescent Light on the Deterioration of Tissue Culture Medium. In Vitro 12:19-22 (1976).

5. McLimans, W. F. The Gaseous Environment of the Mammalian Cell in Culture. Chapter 5 in Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture; G. H. Rothblat and V. J. Cristofalo, eds. (Academic Press, New York, 1972) 137-170.

6. Case-Gould, M. J. Endotoxin in Vertebrate Cell Culture: Its Measurement and Significance. In Uses and Standardization of Vertebrate Cell Lines, (Tissue Culture Association, Gaithersburg, MD, 1984) 125-136.

7. Fogh, J., Holmgren, N. B. and Ludovici, P. P. A Review of Cell Culture Contaminations. In Vitro 7(1):26-41 (1971).

8. Contaminants in Tissue Culture. J. Fogh, ed. (Academic Press, New York, 1973).

9. Barkley, W. E. Safety Considerations in the Cell Culture Laboratory. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58. W. B. Jacoby and I. H. Pastan, eds. (Academic Press, New York, 1979) 36-44.

10. Robinson, L. B., Wichelhausen, R. H. and Roizman, B. Contamination of Human Cell Cultures by Pleuropneumonia like Organisms. Science 124:1147-1148 (1956).

11. Rottem, S. and Barile, M. F. Beware of Mycoplasmas. Trends in Biotechnology 11:143-150 (1993).

12. Lincoln, K. L., and Gabridge, M. G. Cell Culture Contamination: Sources, Consequences, Prevention and Elimination. In Methods in Cell Biology, Vol. 57 (Academic Press, New York, 1988) 49-65.

13. Luzak, J., Pawar, S. A., Knower, S. A., Cox, M. S., Dubose Jr., J. and Harbell, J. W. Trends in the Incidence and Distribution of Mycoplasma Contamination Detected in Cell Lines and Their Products (Presented at the World Congress on Cell and Tissue Culture, June, 1993).

14. McGarrity, G. J. Working Group on Cell Culture Mycoplasmas. Annual report to the International Research Program in Comparative Mycoplasmology (International Organization of Mycoplasmology, 1988).

15. Barile, M. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: a Status Report. In Cell Culture and Its Applications. (Academic Press, New York, 1977) 291-334.

16. Lincoln, C. K., and Lundin, D. J. Mycoplasma Detection and Control. United States Federation for Culture Collection Newsletter 20 (4):1-3 (1990).

17. Ryan, J. A. and Mariano, J. A. Frequently Asked Mycoplasma Questions. Bionique Testing Laboratories Mycoplasma Resource Center, Saranac Lake, NY www.bionique.com/mycoplasma-resources.html (2010).

18. McGarrity, G. J., Sarama, J. and Vanaman, V. Cell Culture Techniques. ASM News 51:170-183 (1985).

19. Gartler, S. M. Genetic Markers as Tracers in Cell Culture. National Cancer Institute Monograph 26:167-195 (1967).

20. Gartler, S. M. Apparent HeLa Cell Contamination of Human Heteroploid Cell Lines. Nature 217:750-751 (1968).

21. Stulburg, C. S., Peterson, Jr., W. D., and Simpson, W. F. Identification of Cells in Culture. Amer. J. Hematology 1:237-242 (1976).

22. Nelson-Rees, W. A., Daniels, D. W. and Flandermeyer, R. R. Cross-Contamination of Cells in Culture. Science 212:446-452 (1981).

23. Bader, F. G. Sterilization: Prevention of Contamination. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, A. L. Demain and N. A. Solomon, eds. (American Society of Microbiology, Washington DC, 1986). 345-362.

24. Roche, K. L. and Levy, R. V. Methods used to Validate Microporous Membranes for the Removal of Mycoplasma. BioPharm, 22-33, (April 1992).

25. Barile, M. F., Hopps, H. E., Grabowski, M. W., Riggs, D. B. and DelGiudice, R. A. The Identification and Sources of Mycoplasmas Isolated from Contaminated Cell Cultures. Ann. NY Acad. Sci. 225:251-264 (1973).

26. McGarrity, G. J. Spread and Control of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures. In Vitro 12:643-647 (1976).

27. Wolf, K. and Quimby, M. C. Towards a Practical Fail-Safe System of Managing Poikilothermic Vertebrate Cell Lines in Culture. In Vitro 8(4):316-321 (1973).

28. Wolf, K. Laboratory Management of Cell Cultures. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58, W. B. Jacoby and I. H. Pasten, eds. (Academic Press, New York, 1979) 116-119.

29. McGarrity, G J. Detection of Contamination. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58, W. B. Jacoby and I. H. Pasten, eds. (Academic Press, New York, 1979) 18-29.

30. Barile, M. and McGarrity, G. J. Isolation of Mycoplasmas from Cell Cultures by Agar and Broth Techniques. In Methods in Mycoplasmology, Vol. 2, J. G. Tully and S. Razin, eds. (Academic Press, New York, 1983) 159-165.

31. McGarrity G. J., Steiner, T. and Vanaman, V. Detection of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures by DNA Fluorochrome Staining. In Methods in Mycoplasmology, Vol. 2, J. G. Tully and S. Razin, eds. (Academic Press, New York, 1983) 183-190.

32. Dilworth, S, Hay, R. J., and Daggett, P. M. Procedures in Use at the ATCC for Detection of Protozoan Contaminants in Cultured Cells. Procedure 16655, TCA Manual 5 (3):1107-1110 (1979).

33. Peterson, Jr, W. D., Simpson, W. F. and Hukku, B. Cell Culture Characterization: Monitoring for Cell Identification. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58, W. Jacoby and I. H. Pasten, eds. (Academic Press, New York, 1979) 164-177. Worton, R. G. and Duff C. Karyotyping. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58, B. Jacoby and I. H. Pasten, eds. (Academic Press, New York, 1979) 322-345. Reid, Y. A., and Lou, X. Armstrong, S.E., Mariano, J.A., Martino, C.A., and Ryan, J.A. 2012. Identifying Mycoplasma Contamination: Concepts and Tools, In Microbial Identification: The Keys to a Successful Program. Edited by Mary Griffin and Dona Reber, PDA and Davis Healthcare International Publishing. Chapter 8:185-220. In Vitro, 29A:120A (1993).

36. Ryan, J. A. General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures. Corning Technical Bulletin at www.corning.com/lifesciences.

37. Barile, M. F. Mycoplasmal Contamination of Cell Cultures: Mycoplasma-Virus-Cell Culture Interactions. In Contamination in Tissue Culture, J. Fogh, ed. (Academic Press, Inc., New York, 1973) 131-171.

38. Perlman, D. Use of Antibiotics in Cell Culture Media. In Methods in Enzymology: Cell Culture, Vol. 58, W. B. Jacoby and I. H. Pasten, eds. (Academic Press, New York, 1979) 110-116.

39. Ryan, J. A. Endotoxins and Cell Culture. Corning Technical Bulletin at www.corning.com/lifesciences.

40. Weiss, R. A. Why Cell Biologists Should Be Aware of Genetically Transmitted Viruses. In National Cancer Institute Monograph 48:183-190 (1978).

41. Lundin, D. J. and Lincoln, C. K. Mycoplasmal Contamination of Cell Cultures within the Clinical Diagnostic Laboratory. Amer. Clin. Lab. (April 1994).

42. Hay, R. J., Reid, Y. A., Miranda, M. G. Chen, T. C. Current Techniques for Cell Line Authentication. Biotechnology International 143-147.

43. NSF49-2004a NSF International Standards. Class II (Laminar Flow) Biohazard Cabinetry. Ann Arbor, MI.

44. Geraghty, R. J.,Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R. W., Meredith, J., Stacey, G.N., Thraves, P., and Vias, M. Guidelines for the Use of Cell Lines in Biomedical Research. British Journal of Cancer (2014) 111:1021-1046. (Available online)

45. Meechan, P. J. and Wilson, C. Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets: A Contrarian View. Applied Biosafety, 11(4):222-227.

46. Uphoff, C. C., Lange, S., Denkmann, S. A., Garritsen. H, S, P. and Drexler, H. G. Prevalence and Characterization of Murine Leukemia Virus Contamination in Human Cell Lines. PLoS ONE 10(4):e0125622. doi:10.1371/journal.pone.0125622 (2015).

47. Ryan, J. A. Mycoplasma Detection using DNA Staining Protocol at www.corning.com/lifesciences.

48. Akers, J. A., Meltzer, T. H. and Jornitz, M. W. The Reoccurrence of Mycoplasma Contamination: Prevention Strategies. BioProcess International Filtration Supplement. Available at www.bioprocessintl.com.

49. Coecke, S., *et al.* A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA 33, 261-287 (2005).

50. Ryan, J. A. and Mariano, J. A. Why Does Over Use of Antibiotics Result in Higher Mycoplasma Contamination Rates? Bionique Testing Laboratories, Mycoplasma Resource Center, Saranac Lake, NY. www.bionique.com/mycoplasma-resources/faq/mycoplasma-contamination-antibiotics-overuse.html (2010).

51. Armstrong, S. E., Mariano, J. A., Martino, C. A., and Ryan, J. A. 2012. Identifying Mycoplasma Contamination: Concepts and Tools, In Microbial Identification: The Keys to a Successful Program. Edited by Mary Griffin and Dona Reber, PDA and Davis Healthcare International Publishing. Chapter 8:185-220.

52. 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. and Freshney, R. I. Check Your Cultures! A list of Cross-contaminated or Misidentified Cell Lines. Int. J. Cancer. 127:1-8 (2010).

53. Ryan, J. A. and Mariano, J. A. Creating a Certified Working Cell Bank for Important Cell Lines in Your Research Program. Bionique Testing Laboratories, Mycoplasma Resource Center, Saranac Lake, NY. www.bionique.com/mycoplasma-resources/technical-articles/certified-working-cell-bank.html(2010).

54. Armstrong, S. E., Mariano, J. A. and Lundin, D. J The Scope of Mycoplasma Contamination Within The Biopharmaceutical Industry. Biologicals 38 (2010) 211-213.

55. Freedman, L. P., Gibson, M. C., Wisman, R., Ethier, S. P., Soule, H. R., Reid, V. A. and Neve,

56. M. The Culture of Cell Culture Practices and Authentication—Results from a 2015 Survey. BioTechniques 59:189-192 (October 2015).

57. Buehring, G. C., Eby, E. A. and Eby, M. J. Cell Line Cross-contamination: How Aware Are Mammalian Cell Culturists of the Problem and How To Monitor It? In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 40:211-215 (2004).

58. Drexler, H. G. and Uphoff, C. C. Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Incidence, Sources, Effects, Detection, Elimination, Prevention. Cytotechnology 39:75-90 (2002).

59. Burgener, J. Position Paper on the Use of Ultraviolet Lights in Biological Safety Cabinets. Applied Biosafety, 11(4):228-230 (2006).

60. Yu, M *et al.* A Resource For Cell Line Authentication, Annotation and Quality Control. Nature, 520:307-311. doi:10.1038/nature 14397 (April 16, 2015).

61. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities (www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/toc.html), Centers for Disease Control, Atlanta GA (2008).

62. The Center for Disease Control and Prevention (CDC) in the Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th edition HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.

PODĚKOVÁNÍ

Corning jakožto autor originálního znění článku by rád ocenil přínosy Johna Ryana k tomuto článku. Autor by rád poděkoval Bionique Testing Laboratories, Inc. za užitečné diskuse, mikrofotografie a přístup k datům o problémech a incidenci kontaminace mykoplazmou.

NĚCO MÁLO O BARII

Společnost Baria vznikla v roce 2002 a dodává produkty, materiál a přístroje jak do klinických laboratoří, tak pro výzkumné i průmyslové účely. Od počátku se zaměřujeme především na špičkovou kvalitu distribuovaného zboží, které pochází od předních dodavatelů a odpovídá poznatkům současné vědy.

Poskytujeme také odbornou podporu a servis, naši zaměstnanci mají dlouholeté zkušenosti s prací v laboratoři a zároveň jsou to ochotní lidé, kteří vám rádi s čímkoliv pomohou.

baria

CORNING