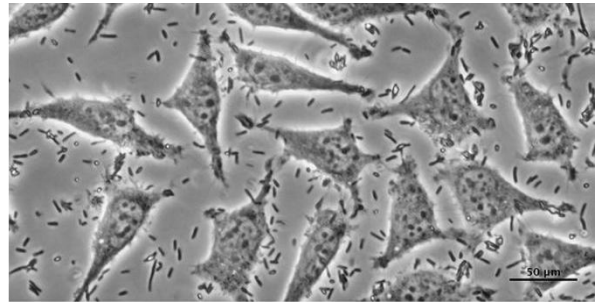


# Gentechnik: Kontaminationen in der Zellkultur

Bei Probennahmen im Zuge der Überwachung durch die Gentechnik Behörde werden leider immer wieder kontaminierte Zelllinien gefunden. Nicht schön, wenn die Zellen dadurch plötzlich in S2 eingestuft sind! Dieser Beitrag basiert auf dem Schulungsseminar in 2023 und fasst die wichtigsten Infos zusammen.

## Bakterien

Die meisten Kontaminationen mit Bakterien, Hefen und Pilzen werden schnell während der Kultivierung erkannt: pH Shift, Trübung, langsames Wachstum, Lichtmikroskopie:



### Ausnahme Mycoplasmen:

- 15-35% aller tierischen und humanen Zellkulturen kontaminiert.
- Zellwandlos
- Durchdringen selbst Filter mit Porengröße von 0,2µm.
- Führen nicht zur Trübung von Medien und sind nicht unter dem Lichtmikroskop zu sehen.
- Resistent gegen häufig eingesetzte Antibiotika wie z.B. Penicillin, Streptomycin, Gentamycin.
- Kontamination durch sterilfiltrierte Lösungen, wie z.B. FCS (*M. arginini*) oder Trypsin (*M. hyorhins*) oder durch mangelnde Hygiene. Sie können auch in LN2 von einem Kryoröhrchen auf das andere übertragen werden.
- Bis auf *M. orale* alle in **Risikogruppe 2** eingestuft.

Der Nachweis erfolgt mittels PCR ([siehe Methode des LAG](#)) und die Charakterisierung auf Spezies Ebene mittels Restriktionsverdau:

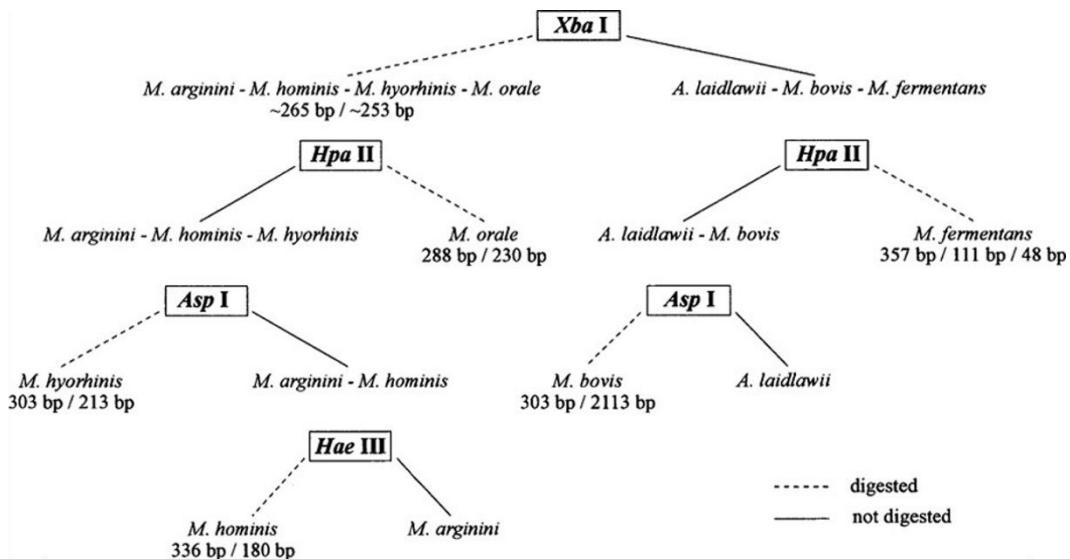


Tabelle 11: Restriktionsverdau der Mykoplasma-PCR-Amplifikate

| Restriktions-<br>enzym | Proben                     |                            |                            |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 2018/111                   | 2018/112                   | 2018/113                   |
| Xba I                  | geschnitten, (2 Fragmente) | geschnitten, (2 Fragmente) | geschnitten, (2 Fragmente) |
| Hpa II                 | nicht geschnitten          | nicht geschnitten          | nicht geschnitten          |
| Tth111                 | geschnitten, (2 Fragmente) | geschnitten (2 Fragmente)  | geschnitten (2 Fragmente)  |
| Hae III                | nicht geschnitten          | nicht geschnitten          | nicht geschnitten          |

16.11.2023

## Viren

### HIV-1, HTLV-I und –II, HBV, HCV

- Können in humanen Proben und somit in Primärzellen vorkommen.
- Diese sind in **RG 2** eingestuft, wenn nicht negativ getestet.
- HBV und HCV können nicht in unbehandelten permanenten humanen Zellkulturen vermehrt werden. Die DSMZ konnte in 2010 keine Kontamination in 465 Zelllinien feststellen.
- HIV und HTLV können sich in permanenten Zellkulturen vermehren. Die DSMZ konnte in 2010 keine Kontamination in 465 Zelllinien feststellen.

### Warum/Wann testen?

Bei neuen Primaten Zellkulturen, wenn Proband nicht HIV, HBV, HCV negativ. Sonst Einstufung der Arbeiten in S2!

### Epstein Barr Virus (EBV)

- Kommt ubiquitär in der Bevölkerung vor.
- Wird zur Immortalisierung von B-Zelllinien genutzt.
- Die DSMZ fand 2010 39/465 kontaminierte Zelllinien (=8,4%), alle stammten von B-Zellen ab.
- EBV positive Zelllinien sind in **RG 2** eingestuft. Bei Abwesenheit replikations-komp. Partikel kann durch die ZKBS (!) in RG 1 herabgestuft werden.

## Warum/Wann testen?

Unterscheidung von „echter“ Tumorzelllinie und EBV kontaminierter B-LCL.

Siehe auch [ZKBS Stellungnahme 402.45244.0046](#)

## Xeno-, polytropic murine leukemia viruses (XMRV, MLV)

- Gamma-Retrovirus
- Die DSMZ fand 2015 19/577 kontaminierte Zelllinien (=3,3%). 17 produzierten auch einen MLV.
- Bisher keine Humanpathogenität gesichert, allerdings breiter Zelltropismus *in vitro* nachgewiesen.
- Biostoff: Einstufung in RG 1 (siehe TRBA 468 und Stellungnahme 17/2014).
- ACHTUNG: Da Insertionsmutagenese und Rekombination mit genutzten Retroviralen Systemen nicht ausgeschlossen werden kann, gilt bei gentechnischen Arbeiten **RG 2 und somit S2 für XMRV** und Arbeiten mit Zelllinien, die infektiöse, replikationskompetente Partikel abgeben.

## Warum/Wann testen?

- Bei Xenotransplantaten aus Mäusen,
- bei Nutzung von Maus Feeder Layern,
- bei möglichen Kreuz-Kontaminationen *in vitro* (mit den o.g. Zellkulturen)

Siehe auch [ZKBS Stellungnahme Az. 6790-05-02-0059](#)

## Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV)

- In 2008 waren bei den Probennahmen 128/4279 Zelllinien kontaminiert (=3%).
- Die DSMZ fand 2010 nur 6/434 kontaminierte Zelllinien (=1,4%).
- **Einstufung in RG 2** aufgrund breitem Wirtstropismus und Möglichkeit durch Insertionsmutagenese zelluläre Onkogene zu aktivieren oder regulator. Gene zu induzieren.
- Gefahr der Komplementierung während viraler Transduktion mit replikationsdefizienten Retroviren.

Siehe auch [ZKBS Stellungnahme 6790-05-02-37](#)