

Die häufigsten Kontaminationen in der Zellkultur und wie man sie vermeidet.



Seeing beyond

Datum: April 2023

Der Grundstock solider Forschung und des wissenschaftlichen Fortschritts liegt in der Verlässlichkeit von Forschungsergebnissen. Good Practice und Peer Review Verfahren sorgen dafür, dass weitergegebenes Wissen einem gesicherten Qualitätsstandard entspricht. Biologische Zellkulturkontaminationen stellen diese Standards jedoch immer wieder in Frage. Nach Studien der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) sind 35 % aller Zellkulturen weltweit allein mit Mykoplasmen, nur einer der zahlreichen Zellkulturkontaminationen, belastet. Biologische Zellkulturkontaminationen gelten im Labor-Alltag eher als die unangenehme, aber hinnehmbare Norm. Sie richten jedoch jedes Jahr wirtschaftlichen Schaden im Bereich mehrerer hundert Millionen Dollar an. In diesem Artikel erfahren Sie, mit welchen Kontaminationen Sie im Laboralltag rechnen müssen und wie Sie sie vermeiden können.

Die häufigsten Kontaminationen im Labor

Kontaminationen durch Bakterien, Pilze und Hefen gehören zu den häufigsten in der Zellkultur, da sie uns überall und zu jeder Zeit umgeben. Die nicht vorhandene Konkurrenz um Nährstoffe unter perfekten Kulturbedingungen bietet ideale Voraussetzungen für ungehindertes Wachstum.

Bakterien

Bakterien kommen in verschiedenen Zellformen vor. Sie können rund (*cocci*), stäbchenförmig (*bacilli*) und spiralförmig (*spirilla*) sein. Mikroskopisch identifizierbar sind bakterielle Kontaminationen anhand ihrer Morphologie, einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1 μm und einer Länge von bis zu 20 μm und aktiver oder passiver (Brownsche Molekularbewegung) Bewegung zwischen den Zellen der Zellkultur. Bakterien können einzeln, in Ketten ab zwei Zellen oder in Clustern auftreten.

Achtung bei:

- beweglichen **schwarzen Punkten** und **Stäbchen** zwischen den Zellen oder einer schimmernd **glänzenden Fläche** im zellfreien Raum
- sich schnell und directional bewegenden Objekten
- Trübung des **Phenolrot-Kulturmediums** und plötzlich **stark gelb** verfärbtem Medium (stark sauer) über Nacht (aerobes Wachstum)
- Trübung des **Phenolrot-Kulturmediums** und plötzlich **stark pink** verfärbtem Medium (stark basisch) über Nacht (anaerobes Wachstum)

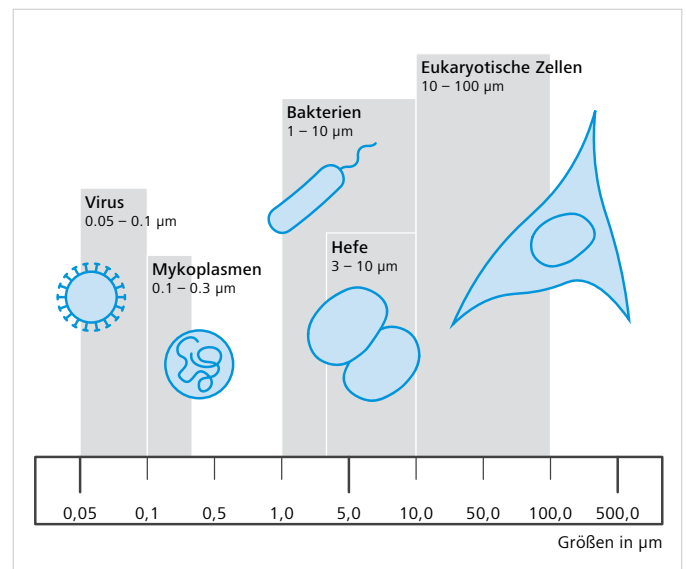


Abbildung 1 Größenvergleich verschiedener biologischer Zellkulturkontaminationen

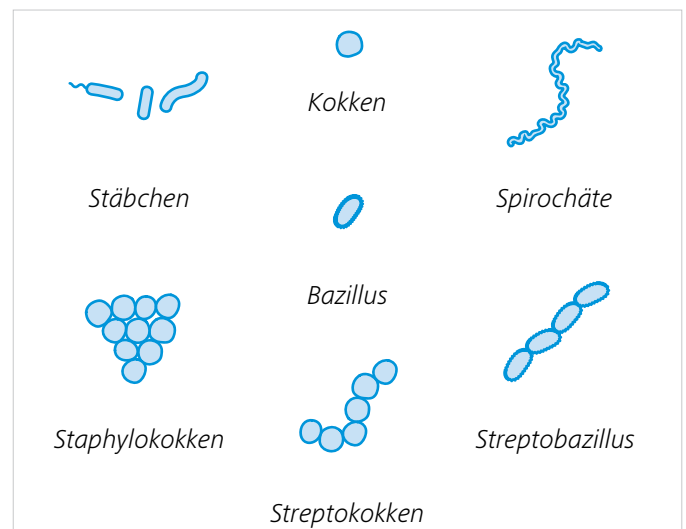


Abbildung 2 Morphologie von Bakterien

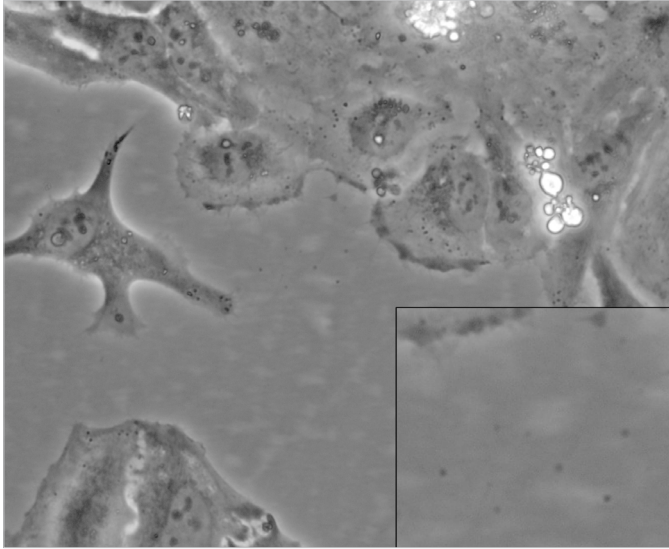


Abbildung 3 U2OS Zellen, frühes Stadium einer Kontamination mit Bakterien. Aufgenommen mit ZEISS Axiovert 5 digital.



Abbildung 4 ZEISS Axiovert 5 digital

Detektion:

Bakterielle Kontaminationen können dank ihrer Größe mittels konventioneller Lichtmikroskopie einfach detektiert werden.

Mit inversen Mikroskopen, einer 100x – 400x-Vergrößerung und Phasenkontrast wird der Kontaminationscheck einfach in die bestehende Laborroutine integriert.

Häufige Kontaminationsquellen:

Geht es um den Schutz vor Kontaminationen ist jeder zusätzliche Handgriff und jedes zusätzliche Laborutensil zuviel. Je weniger komplex das Zellhandling durchgeführt wird, desto geringer das Risiko. Denn die häufigsten bakteriellen Kontaminationsquellen sind:

- verunreinigte Reagenzien und Medien
- Labor-Personal/häufig wechselnde Nutzer
- nicht sterile Laborutensilien (Wasserbäder, Kulturflaschen etc.)
- bereits kontaminierte Zellisolate

Prävention:

Um bakterielle Kontaminationen möglichst schnell zu entdecken oder womöglich von vornherein zu unterbinden, zählt es sich aus, die Zellkultur möglichst regelmäßig und in kurzen Abständen mit Hellfeldmikroskopie und Kontrasttechnik auf Kontaminationsherde zu kontrollieren. Alle Arbeitsmethoden sollten steril und standardisiert durchgeführt werden. Arbeitsflächen und Utensilien sollten effektiv sterilisiert und alle Filter in Raumbelüftung, Sterilbank und Pipettierhilfen regelmäßig gewechselt werden. Sollte sich dennoch eine Kontamination ein-

geschlichen haben, helfen antimykotische Mittel, um wichtige Zellkulturen zu schützen.

Im Falle einer Kontamination:

Bei lokaler Kontamination, Arbeitsutensilien desinfizieren und Kultur-Reagenzien und -Medien entsorgen. Lokale Kontaminationen können gegebenenfalls mittels Antibiotika eliminiert werden. Vorsicht bei Verwendung der Forschungsergebnisse. Bei starker Kontamination, Zellen entsorgen. Bei bereits ausgebreiteter Kontamination auf mehrere Kulturen, Zellen entsorgen, Zellkultur-Equipment, Brutschränke und Räumlichkeiten desinfizieren. Reagenzien und Kultur-Medien austauschen.

Pilze

Pilze werden bei Routine Check-Ups mittels Mikroskopie oft übersehen, da sie in der Kultur häufig an der Oberfläche schwimmend sehr lokal auftreten und in frühen Stadien oft mit Fasern von Filtern verwechselt werden können. Zu erkennen sind Pilze als gräuliche oder grünliche Objekte schwimmend auf der Oberfläche des Kulturmediums oder als lokales schnurartiges Hyphengeflecht unter der Oberfläche.

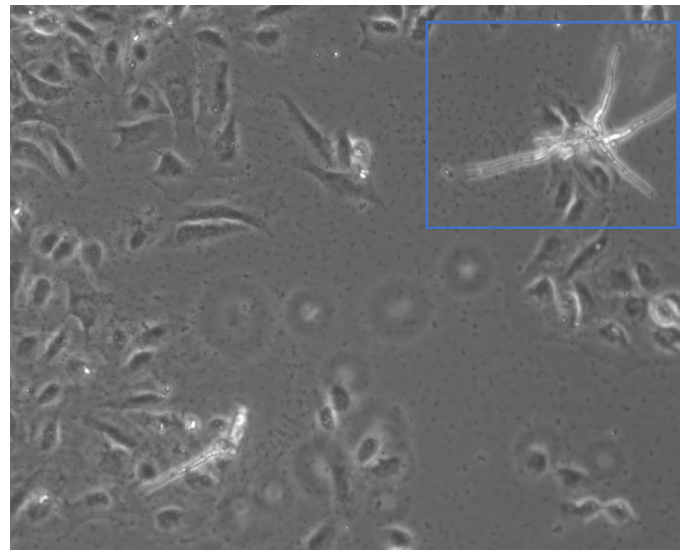


Abbildung 5 Kontaminierte Zellkultur; markiert in Blau: anfängliches Stadium eines Pilz-Mycel-Geflechts

Achtung bei:

- Trübung des Phenolrot-Kulturmediums
- plötzlicher Pinkfärbung (stark basisch) des Phenolrot-Kulturmediums über Nacht
- schwimmenden Strukturen in der Zellkulturflasche
- sichtbarer Hyphenbildung

Detektion:

Für geübte Augen sind Pilze auch in der Frühphase der Kontamination sehr gut auch ohne mikroskopische Unterstützung einfach zu identifizieren. Jedoch helfen lichtmikroskopische

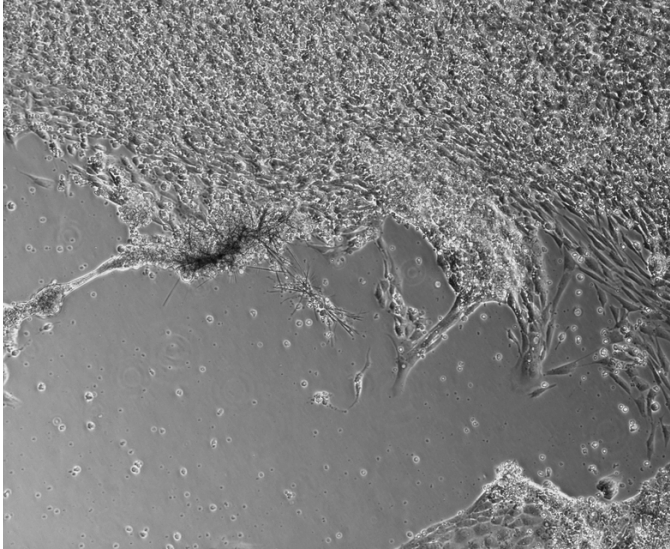


Abbildung 6 Eukaryotische Zellen, die von einem nicht identifizierten Pilz kontaminiert und abgetötet wurden. Mit freundlicher Genehmigung von Katherine L. McCoy, Sana Biotechnology, USA

Methoden, um Pilzkontaminationen sicher zu bestätigen oder auszuschließen. Hierfür eignen sich insbesondere inverse Mikroskope, die Phasenkontrast bieten.

Häufige Kontaminationsquellen:

- verunreinigte Filter (Werkbank, Kulturflaschen, Pipetten/ Pipettierhilfen)
- nicht sterile Arbeitsmethoden
- Kontamination durch Umgebungsluft (Lüftungen und offene Türen)
- mit Sporen kontaminierte Reagenzien und Flüssigkeiten

Prävention:

Um die Zellkultur dauerhaft vor Pilzkontaminationen zu schützen, besteht die beste Vorsorge in standardisierten sterilen Arbeitsprozessen und regelmäßigen Kontrollen. Antibiotika können zwar einen Großteil der Kontaminationen verhindern, führen aber eventuell auch zu einem nicht physiologischen Verhalten der Zellen. Da Pilzsporen sich schnell und unbemerkt über die Raumluft verbreiten, sind regelmäßige Filterwechsel, an steriler Werkbank sowie Pipetten, und geschlossene Türen und Fenster ein absolutes Muss. Kontaminationsbrücken durch durchnässte Filter der Kulturflaschen und Pipetten und unsauberes Arbeiten müssen unter allen Umständen vermieden und sämtliche Oberflächen regelmäßig von Staub befreit und desinfiziert werden. Mikroskopie sollte bestenfalls unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt werden. Außerdem wichtig: Nie über die offenen Zellkulturflasche greifen oder arbeiten.

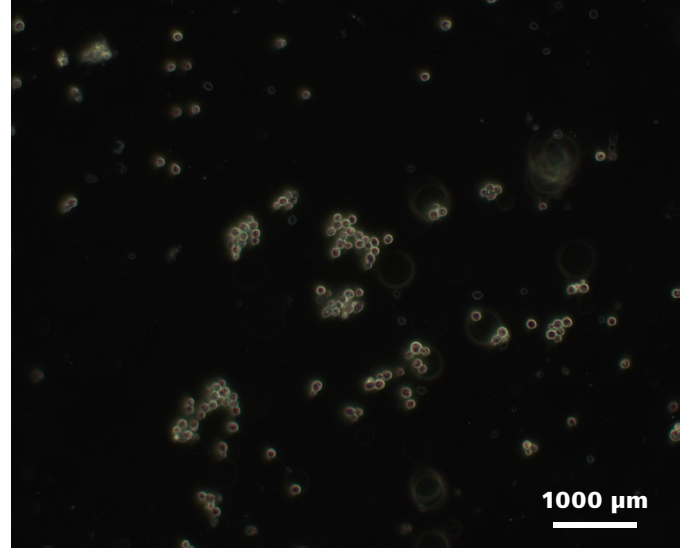


Abbildung 7 Bakterien in probiotischen Lebensmitteln

Im Fall einer Kontamination:

Falls in der Zellkultur Pilzkontaminationen entdeckt werden gilt es, den Kulturbehälter möglichst schnell und vorsichtig aus dem Brutschrank zu entfernen und in anderen Kulturflaschen nach weiteren Kontaminationen zu suchen. Sind keine weiteren Kontaminationen aufgetreten, ist es dennoch ratsam alle Filter der Zellkultur zu tauschen und verbleibende Zellen möglichst bald zu passagieren. Da Pilzbefall in der Zellkultur meist sehr lokal auftritt, sollte eine Desinfektion aller Oberflächen des Zellkulturlabors und eine Reinigung des Inkubators ausreichen. Bereits verwendete/ angebrochene Kulturmedien und Reagenzien sollten entsorgt werden.

Hefen

Hefen sind einzellige Pilze und vermehren sich durch Spaltung oder Sprossung. Dies führt zu den charakteristischen Erkennungsmerkmalen unter dem Phasenkontrastmikroskop. Hefen sind rund bis oval und treten oft allein, als Zweierverbände oder Ketten auf, welche sich im Medium zwischen den

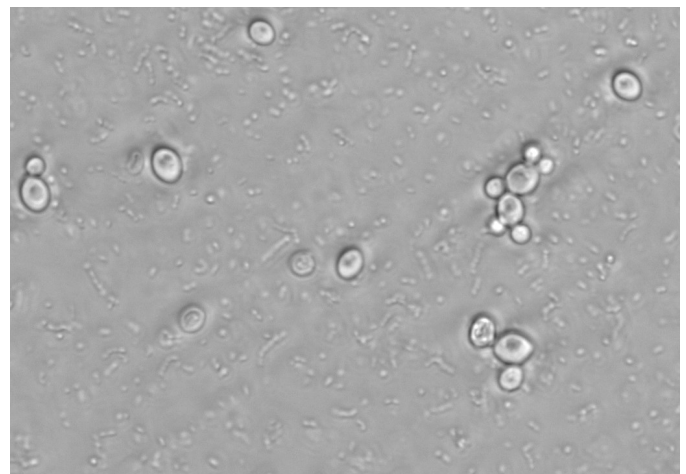


Abbildung 8 Kontaminierte Zellkultur mit Hefe und Bakterien

Zellen der Zellkultur befinden. Auch ihre Größe von 3–4 µm im Durchmesser machen Hefekontaminationen mittels Lichtmikroskopie einfach detektierbar.

Achtung bei:

- starker Trübung des Kulturmediums
- Verfärbungen des Mediums treten oft erst spät im Laufe einer Kontamination auf und helfen nicht zu einer frühzeitigen Detektion.

Detektion:

Hefen können sehr gut mittels Phasenkontrast und ab 100× Vergrößerung mikroskopisch detektiert werden. Selbst bei frühen Stadien der Kontamination fallen die runden bläschenförmigen Hefen unter einem inversen Zellkulturmikroskop deutlich auf.

Häufige Kontaminationsquellen:

- Übertragung meist über Umgebungsluft (z.B. Luftzug im Zellkulturlabor)
- Hefen können sich in Luftfiltern festsetzen und über lange Zeit an die Umgebungsluft abgegeben werden
- Übertragung oft durch Staub und Hautschuppen an Laborkleidung

Prävention:

- standardisierte Arbeitsprozesse
- sterile Arbeitstechniken und regelmäßiges desinfizieren
- häufiges Öffnen von Türen vermeiden
- Arbeitskleidung regelmäßig waschen bzw. Laborkittel nur im Zellkulturlabor tragen
- nicht über offene Kulturen greifen
- Einsatz von Penicillin und Strepomycin

Im Fall einer Kontamination:

Bei lokaler Kontamination Arbeitsutensilien desinfizieren und Kultur-Reagenzien und -Medien entsorgen. Lokale Kontaminationen können gegebenenfalls mittels Antibiotika unterdrückt werden. Eine Eradikation ist jedoch selten erfolgreich. Demnach sollte man vorsichtig bei Verwendung der Forschungsergebnisse sein. Bei starker Kontamination, Zellen sofort entsorgen. Bei bereits ausgebreiteter Kontamination auf mehrere Kulturen, Zellen entsorgen, Zellkultur-Equipment, Brutschränke und Räumlichkeiten desinfizieren. Reagenzien und Kulturmedien austauschen. Arbeitstechniken für steriles Arbeiten optimieren.

Zeit ist bei der Bekämpfung von Zellkulturkontaminationen entscheidend, denn je früher die Kontamination entdeckt und beseitigt wird, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ernsthafte Folgen zu erwarten sind. Gerade deshalb gehören Kontaminationen mit [Mykoplasmen und Viren](#) zu den gravierendsten Gefahren einer Zellkultur.

Infizierten Zelllinien zeigen nicht immer sichtbare Schäden oder Veränderungen der Kultur. Die kleine Größe macht den Nachweis von Mykoplasmen mittels Lichtmikroskopie beinahe unmöglich und Viren können nur mit speziellen PCR Assays identifiziert werden.

Mykoplasmen

Mykoplasmen sind mit ca. 0,3 µm Durchmesser die kleinsten Bakterien und besitzen keine richtige Zellwand und deshalb auch keine charakteristische Form. Durch ihre meist parasitäre Lebensweise sind sie eine große Gefahr für jede Zellkultur. Mykoplasmen verursachen in frühen Stadien der Kontamination weder pH-Veränderungen im Medium noch detektierbare Veränderungen in Morphologie oder Toxikologie von eukaryoten Zellen. Es gibt also kaum rechtzeitige Anzeichen für eine Kontamination. Jedoch können Mykoplasmen selbst in geringer Zahl unter anderem zu Stoffwechselstörungen, Nukleinsäuresynthesedefekte, Chromosomenveränderungen und zu veränderter Transfizierbarkeit führen.

Achtung:

Durch die fehlenden „äußeren Merkmale“ einer frühen Kontamination wird generell empfohlen, die bestehende Zellkultur in regelmäßigen Abständen vorsorglich (alle 1–2 Monate) auf Mykoplasmen zu testen.

Detektion:

Für eine sichere und eindeutige Detektion der Kontaminationen können diverse Tests verwendet werden. Ein erster schneller Check kann über eine Hoechst 33258 oder DAPI Färbung einer Kontrollkultur erfolgen. Hierbei wird ein Aliquot der Hauptkultur ausgesät und mit DNA-färbenden Reagenzien behandelt. Bei einer weiter fortgeschrittenen Kontamination können mittels Fluoreszenzmikroskopie ab einer ca. 400× Vergrößerung bereits akkumulierte Signale entlang der Zellmembran der Zellen detektiert werden. Um jedoch sicher gehen zu können, dass eine Mykoplasma-Kontamination vorliegt, empfiehlt sich ein PCR Test mit Primern spezifisch für die 16s RNA der geläufigsten Mykoplasmen Stämme. So können auch Kontaminationen im Frühstadium erkannt und behandelt werden, bevor die Kontamination die gesamte Zellkultur schädigt. Durch die hohe Relevanz für die Integrität der Zellkultur, kann auf eine Vielzahl verschiedenen Assays und Dienstleitern zur Mykoplasma Detektion zurückgegriffen werden.

Häufige Kontaminationsquellen:

- Übertragung vom Menschen (Kleidung, Kopfhaar und Hautschuppen, Husten und Niesen, Sprechen in Richtung der Laminar Flow Bench)
- häufig wechselndes Laborpersonal
- fehlende oder fehlerhafte sterile Arbeitstechniken
- bereits kontaminierte Kulturen von Herstellern und Kooperationspartnern
- bereits kontaminierte Seren, Medien und Reagenzien

Prävention:

Da menschliche Interaktion mit der Zellkultur zu den Haupt-Kontaminations-Faktoren gehört, muss präventiv auch hier angesetzt werden. Für sterile Arbeitsweisen ist es sehr wichtig stets einen sauberen Laborkittel und möglichst eine Maske zu tragen. Unterhaltungen im Zellkulturlabor sollten vermieden werden, genau wie das Arbeiten mit Erkältungssymptomen. Sehr gut desinfizierte und stets neue Handschuhe sowie für Zellkultur spezifische Schuhe sind essenziell.

Neue Zelllinien, Medien und Seren sollten vor der Verwendung nicht zu lange gelagert werden und auf bereits bestehende Kontaminationen untersucht werden. Angebrochene Laborutensilien wie z.B. Zellkulturflaschen müssen möglichst steril geöffnet und wieder verschlossen werden. Alle Laborutensilien sollten wenn möglich steril gelagert werden und erneut desinfiziert werden, bevor sie unter die Laminar Flow Bench gelangen. Die Zellkultur sollte möglichst schnell und effizient durchgeführt werden, um unnötige Exposition zur Raumluft zu reduzieren.

Sterilbänke sollten regelmäßig gewartet und desinfiziert werden (z.B. mittels UV Licht). Inkubatoren sollten nicht überfüllt werden, um das Übertragen von Mykoplasmen-Kontaminationen von Kultur zu Kultur zu vermeiden.

Im Fall einer Kontamination:

Sollten Mykoplasmen in der Zellkultur nachgewiesen werden, muss die betroffene Kulturflasche möglichst schnell entsorgt werden. Sollte die Kultur sehr wichtig oder sehr teuer sein, kann auch eine Eradikation mit verschiedenen Antibiotika (z.B. Plasmocin) versucht werden. Eine begleitende Behandlung mit Tetracycline und Baytril wird empfohlen. Die Behandlung kann mehrere Wochen bis Monate dauern. Diese ist jedoch nicht immer erfolgreich und erhöht die Chance, in der Zeit weitere Zelllinien zu infizieren. Denn Mykoplasmen können sich über Kontaminationsbrücken, Wasserdampf im Inkubator oder über Wasserbäder schnell ausbreiten und zu erheblichem Schaden führen. Um das Kontaminationsfenster zu schließen, sollte das komplette Zellkulturlabor desinfiziert, alle Medien und Seren sowie Reagenzien verworfen und ausgetauscht werden. Alle offenen Verbrauchsmittel sollten ebenfalls erneuert werden.

Schlussfolgerung:

Kontaminationen sind ein ernst zu nehmendes Problem. Jedoch sind sie kontrollierbar. Je früher sie detektiert werden, desto geringer ist der Schaden. ZEISS Lichtmikroskope lassen sich hierzu perfekt in die bestehende Laborroutine integrieren, damit Sie jeder Kontamination einen Schritt voraus sind. Für eine routinemäßige Kontrolle lassen sich einfache Mikroskopietechniken direkt in den alltäglichen Workflow integrieren. Mittels inverser Mikroskope wie Axiovert 5 und Primovert, ist es möglich, die häufigsten Kontaminationen schnell, verlässlich und vor allem kostensparend zu erkennen. Kombiniert mit ZEISS AI Cell Confluency und AI Cell Counting, Modulen für Labscope, steigert sich so einfach und schnell die Verlässlichkeit der Zellkultur durch kürzere Verweilzeit außerhalb des Brutschranks.

Bei einer erfolgreich identifizierten Kontamination müssen je nach Art des Erregers, alle Experimente gestoppt, studentische Arbeiten verschoben, alle Laborutensilien und Verbrauchsmaterialien dekontaminiert oder ausgetauscht werden. Im schlimmsten Fall müssen schon publizierte Forschungsergebnisse hinterfragt und eingereichte Manuskripte revidiert werden. Auch Produktionschargen in der Industrie können einer Kontamination zum Opfer gefallen sein und müssen aus Qualitätsgründen zurückgerufen werden. Denn Forschung und auch die Produktion mit kontaminierten Zellen generiert keine verlässlichen Ergebnisse. Zu sehr können die Zellen in ihren Eigenschaften bezüglich Morphologie, Metabolismus und Epigenetik von gesunden Kulturen abweichen.

Interessanterweise sind universitäre Zellkulturen vermehrt von Kontaminationen betroffen. Labore aus der Wirtschaft hingegen weniger. Die Vermutung liegt nahe, dass stetig wechselnde Kulturen und laufend neue Anwender in der Zellkultur Kontaminationen begünstigen. Denn „Risikofaktor-Nummer-Eins“ für Kontaminationen sind der menschliche Fehler und fehlendes Training für sterile Techniken.

Der Schlüssel zur Reduktion des Kontaminationsrisikos liegt im Training der Anwender, einer kurzen Reaktionszeit und demnach einer regelmäßigen Kontrolle der Kulturen. Denn je länger eine Kontamination unentdeckt bleibt, desto größer der Schaden.

Titelbild

Talaromyces sp. nov., Bildgebung mit erweiterter Schärfentiefe zum Studium der Morphologie wachsender Pilze. Aufgenommen mit ZEISS Axio Zoom.V16 und ZEISS AxioCam 512 color. Mit freundlicher Genehmigung von C. Visagie, Institut für Forstwissenschaft und landwirtschaftliche Biotechnik, Universität Pretoria, Südafrika



Carl Zeiss Microscopy GmbH

07745 Jena, Germany

microscopy@zeiss.com

www.zeiss.com/cell-culture