

# Análise eletroforética de isoenzimas para detecção de contaminação cruzada entre linhagem celulares

Electrophoretic analysis of isoenzymes for detection of interspecies cell line cross-contamination

BARROS, Tatiana Ferrara 1  
SIMONI, Isabela Cristina  
FERNANDES, Maria Judite Bittencourt  
Instituto Biológico

Centro de pesquisa e Desenvolvimento da Sanidade Animal  
Av. Rodrigues Alves, 1252, São Paulo  
Brasil - CEP 04014-002

1 Bolsista de iniciação científica/ FAPESP

Autor para correspondência: Judite@biologico.sp.gov.br

Recebido em 17 de julho de 2008; aceito em 04 de setembro de 2008.

## RESUMO

*A importância das linhagens celulares em diversas áreas da pesquisa torna fundamental um monitoramento contínuo quanto à possível contaminação cruzada interespecies. A análise eletroforética de isoenzimas utilizada para identificação da espécie de origem das linhagens celulares pode também determinar uma possível contaminação interespecies. O objetivo deste trabalho é verificar a sensibilidade do método no controle de qualidade das linhagens utilizadas rotineiramente em pesquisa e diagnóstico por meio de uma mistura experimental de pares de linhagens celulares (RK-13/Vero, MDBK/Vero e PK-15/ Vero), utilizando as seguintes isoenzimas: lactato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e esterase. A detecção da contaminação cruzada entre linhagens celulares por meio da análise eletroforética de isoenzimas foi efetiva quando utilizada as isoenzimas, lactato desidrogenase e malato desidrogenase, com uma sensibilidade de 5 e 10% de contaminação, respectivamente. A detecção da glicose-6-fosfato desidrogenase e esterase não foi apropriada em algumas misturas, devido ou à proximidade de migração das bandas ou à sua ausência, mas quando possível, a sensibilidade foi de 5%. O uso de, pelo menos, duas ou mais isoenzimas se faz necessário para obtenção de resultados mais satisfatórios e confiáveis. Um monitoramento de linhagens com fim de controle de qualidade para fornecimento de resultados confiáveis e compatíveis entre laboratórios pode se utilizar dessa técnica que demonstrou um nível de detecção de contaminação entre 5 a 10% da população celular.*

**PALAVRAS-CHAVE:** *linhagens celulares, contaminação cruzada, isoenzimas, análise eletroforética.*

## ABSTRACT

*Electrophoretic analysis of isoenzymes for detection of interspecies cell line cross-contamination. Certification and the authentic source of cell lines had been very important to the scientific area. During the cultivation and handling of cell lines, it had occurred interspecies contamination that are detectable by electrophoretic analysis of isoenzymes. The aim of this work is to study the sensibility of this when identifying interspecies cross-contamination through experimental mixture of cell lines (RK-13/Vero, MDBK/Vero and PK-5/Vero) using these isoenzymes: lactate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and esterase. Detection of cross-contamination was effective for the lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase with 5 and 10% of sensibility, respectively. Because of the close mobility among the bands or even the absence them, the glucose-6-phosphate dehydrogenase and esterase did not always show appropriate but also presented a sensibility of 5%. The cell contamination was identified as ranging 5-10% using at least two isoenzymes. The use of electrophoretic analysis of isoenzymes would be a valuable tool for laboratories which are concerned about establishing effective cell culture quality control.*

**KEY WORDS:** *cell line, cross- contamination, isoenzyme, electrophoresis analyze.*

## I. INTRODUÇÃO

As culturas de células animais *in vitro* são utilizadas em várias áreas de pesquisa. As linhagens celulares contínuas oferecem um nível de reprodutibilidade e, conseqüentemente, de padronização que, normalmente, não se consegue com o uso de culturas primárias (STACEY, 1997; SILVA, et al., 2001). Entre as

principais aplicações das culturas celulares destaca-se o diagnóstico das infecções causadas pelos vírus, pelo isolamento e posterior identificação desses agentes; a produção de vacinas e de reagentes biológicos; e testes para avaliação da toxicidade de biomateriais (CRUZ et al., 1988; HARBELL et al., 1997; SIMONI et al., 1999). A obtenção e uso de linhagens certificadas e de fontes autenticadas tornam-se de extrema importância. A autenticação ou caracterização das linhagens celulares vale-se de um conjunto de dados relativos ao crescimento populacional, citogenética, presença ou ausência de agentes adventícios, suscetibilidade celular a diferentes amostras virais, identificação de espécies e etc. (HAY, 1992; FERNANDES e SIMONI, 1995; SIMONI et al., 1999). A identificação das espécies de origem das linhagens celulares pode ser feita por meio de testes imunológicos, cariótipo ou análise de isoenzimas e, mais recentemente, pelas técnicas moleculares (FERNANDES e SIMONI, 1995; SOTERIOU et al., 1995; SILVA et al., 2001; PARODI et al., 2002).

A maioria dos laboratórios que utiliza células cultivadas *in vitro* mantém diversas linhagens celulares. Assim, acidentes de contaminação cruzada são um problema comum durante o cultivo e manuseio de células que podem invalidar ou comprometer resultados de pesquisa (STULBERG; PETERSON e SIMPSON, 1976; MARKOVIC E MARKOVIC, 1998; SILVA, et al., 2001). Esse tipo de contaminação tem sido relatado desde 1967, com a linhagem Hela através da detecção do seu marcador específico, mas contaminações de outras linhagens e envolvendo culturas inteiras ou apenas populações mistas de células também foram posteriormente relatadas (NELSON-REES; DANIELS e FLANDERMEYER, 1981; SILVA et al., 2001). Esse problema pode ser resolvido não só por obtenção de fontes autenticadas como mencionado acima, mas por procedimentos rigorosos de controle de qualidade e, principalmente, pela introdução nos laboratórios que utilizam culturas celulares, de técnicas para análise rotineira de detecção dessa contaminação interespecies de culturas celulares (HALTON; PETERSON e HUKKU, 1983; HAY, 1992; KOZAC, 1992; STACEY, 1997; MARKOVIC E MARKOVIC, 1998). Dentre estas técnicas, tem-se a eletroforese de isoenzimas, amplamente utilizada para a identificação de espécies de linhagens celulares animais e útil também para detectar esta contaminação (TSAREVA et al., 1976; STULBERG; PETERSON e SIMPSON, 1976; NOVOKHATISKII, 1980; STEUBE; GRUNICKE e DREXLER, 1995; NIMS et al., 1998). Em estudos anteriores foram caracterizadas diversas linhagens celulares de nosso laboratório pela análise eletroforética de isoenzimas, para identificação de espécies das linhagens celulares utilizando as isoenzimas lactato desidrogenase (LDH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDHH) (FERNANDES e SIMONI, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a sensibilidade da técnica de eletroforese de isoenzimas na determinação da contaminação cruzada interespecies de linhagens celulares pela mistura experimental de pares de linhagens celulares visando a uma implementação desse método para controle de qualidade das linhagens utilizadas rotineiramente em pesquisa, diagnóstico e produção de vacinas.

## II. MÉTODOS

**Isoenzimas:** As isoenzimas analisadas foram as desidrogenases: lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27), glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) e malato-desidrogenase (EC 1.1.1.37); e a esterase (EC 3.1.1.1) (HARRIS e HOPKINSON, 1976).

**Linhagens celulares:** As linhagens celulares utilizadas foram: PK-15 (rim suíno – CRL-33), Vero (rim de macaco verde – CCL-81), RK-13 (rim de coelho – CCL-37) e MDBK (rim bovino – CCL-22), mantidas em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e para a linhagem RK-13, acrescido também de 2,95% de caldo de triptose (TPB).

**Mistura dos pares de linhagens celulares:** As suspensões das células das linhagens celulares RK-13, PK-15 e MDBK foram misturadas com as suspensões celulares da linhagem Vero numa concentração final de  $12 \times 10^6$  células nas seguintes proporções: 100%/0% (Experimento 1), 95%/5% (Experimento 2), 89%/11% (Experimento 3), 50%/50% (Experimento 4), 11%/89% (Experimento 5), 5%/95% (Experimento 6) e 0%/100% (Experimento 7).

**Preparo dos extratos isoenzimáticos:** As misturas das suspensões celulares (Experimentos 1-7) foram centrifugadas a 2.500 g/10min. à 4°C e os sedimentos foram submetidos ao rompimento celular pelo método de congelamento e descongelamento descrito em FERNANDES e SIMONI (1995) para obtenção dos extratos isoenzimáticos. Apenas com uma diminuição do volume final de 1mL para 100µL. Os sobrenadantes dos Experimentos 1-7 de cada mistura foram distribuídos em alíquotas de 10µL e estocados a -80°C.

**Eletroforese:** A análise eletroforética das isoenzimas foi feita em gel de poliácridamida vertical e sistema descontínuo (SIMONI et al., 1999). A corrida foi feita com corrente constante de 20 mA, à 4°C até a saída do corante da placa.

**Coloração:** A atividade das isoenzimas desidrogenases foram visualizadas nos géis pela coloração com sais de tetrazolium como descrito por Harris e Hopkinson (1976) e a esterase foi corada com  $\beta$ -naftil segundo Baffi et al. (2003).

### III. RESULTADOS

Na Tabela 1 estão esquematizados os experimentos com as isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH) das misturas das linhagens RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero. Para essa isoenzima foi verificada uma contaminação interlinhagens acima de 10% em todas as misturas (Experimentos 3, 4 e 5).

**Tabela 1** – Detecção eletroforética das isoenzimas da lactato desidrogenase (LDH) nas misturas RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero.

| Porcentagem de mistura das linhagens celulares | LDH (RK-13/Vero) | LDH (PK-15/Vero) | LDH (MDBK/Vero) |
|--|------------------|------------------|-----------------|
| Experimento 1 (100%/0%)                        | controle         | Controle         | controle        |
| Experimento 2 (95%/5%)                         | +/-              | +/-              | +/-             |
| Experimento 3 (89%/11%)                        | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 4 (50%/50%)                        | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 5 (11%/89%)                        | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 6 (5%/95%)                         | -/+              | -/+              | -/+             |
| Experimento 7 (0%/100%)                        | controle         | Controle         | controle        |

A Tabela 2 apresenta os resultados da isoenzima da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) nas misturas das linhagens RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero. Para a mistura RK-13/Vero visualizou-se a contaminação a partir de 5%, mas, apenas, para a isoenzima da linhagem RK-13 (Experimentos 4 a 6); a contaminação da isoenzima da linhagem Vero só foi detectada na mistura 50% (Experimento 4). Nas misturas PK-15/Vero e MDBK/Vero não foi possível observar as contaminações (Experimentos 2 a 6) devido à intensa coloração e proximidade da migração eletroforética da banda das duas linhagens que prejudicou a interpretação e análise dos resultados. Mesmo nas linhagens controle (Experimentos 1 e 7) foi difícil a formação de uma banda nítida.

**Tabela 2** - Detecção eletroforética da isoenzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) nas misturas RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero.

| Porcentagem de mistura das linhagens celulares | G-6-PDH * (RK-13/Vero) |
|--|------------------------|
| Experimento 1 (100%/0%)                        | controle               |
| Experimento 2 (95%/5%)                         | +/-                    |
| Experimento 3 (89%/11%)                        | +/-                    |
| Experimento 4 (50%/50%)                        | +/+                    |
| Experimento 5 (11%/89%)                        | +/+                    |
| Experimento 6 (5%/95%)                         | +/+                    |
| Experimento 7 (0%/100%)                        | controle               |

\* não detecção de bandas nas misturas PK-15/Vero e MDBK/Vero

Para a isoenzima malato desidrogenase-MDH (tabela 3), a detecção da contaminação na mistura PK-15/Vero foi vista a partir de 5% (Experimentos 2 a 6). Para mistura RK-13/Vero também houve uma detecção a partir de 5% mas apenas para a linhagem RK-13 (Experimentos 4 a 6); nos experimentos com contaminação de Vero (Experimentos 2 a 4), só no experimento 4 (50%/50%) ocorreu essa detecção. Já na mistura MDBK/Vero, a contaminação foi observada em todas os experimentos exceto no Experimento 2 (95%MDBK/5%Vero), indicando uma sensibilidade de 10% e 5% respectivamente para a Vero e MDBK.

**Tabela 3** - Detecção eletroforética da isoenzima malato desidrogenase (MDH) nas misturas RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero.

| Porcentagem de mistura das linhagens celulares | MDH (RK-13/Vero) | MDH (PK-15/Vero) | MDH (MDBK/Vero) |
|--|------------------|------------------|-----------------|
| Experimento 1 (100%/0%)                        | controle         | controle         | controle        |
| Experimento 2 (95%/5%)                         | +/-              | +/+              | +/-             |
| Experimento 3 (89%/11%)                        | +/-              | +/+              | +/+             |
| Experimento 4 (50%/50%)                        | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 5 (11%/89%)                        | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 6 (5%/95%)                         | +/+              | +/+              | +/+             |
| Experimento 7 (0%/100%)                        | controle         | controle         | controle        |

No estudo das isoenzimas da esterase (tabela 4) e misturas RK-13/Vero e PK-15/Vero, a contaminação só pode ser analisada unilateralmente, pois não houve a visualização de bandas na linhagem Vero em todos os experimentos, inclusive no controle (Experimento 7). A detecção de contaminação unilateral da RK-13 e PK-15 foi a partir de 5% (Experimentos 4 a 6). Na mistura MDBK/Vero, as bandas da linhagem MDBK também não foram detectadas, inviabilizando assim qualquer análise de contaminação. Uma mistura adicional foi realizada com as linhagens celulares RK-13/PK-15 em que verificou a contaminação para ambas as células a partir de 5%.

**Tabela 4** - Detecção eletroforética das isoenzimas da esterase nas misturas RK-13/Vero, PK-15/Vero e MDBK/Vero, e na mistura adicional RK-13/PK15.

| Porcentagem de mistura das linhagens celulares | Esterase (RK-13/Vero) | Esterase (PK-15/Vero) | Esterase RK-13/PK-15 |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Experimento 1 (100%/0%)                        | controle              | controle              | controle             |
| Experimento 2 (95%/5%)                         | +/n.d.                | +/n.d.                | +/+                  |
| Experimento 3 (89%/11%)                        | +/n.d.                | +/n.d.                | +/+                  |
| Experimento 4 (50%/50%)                        | +/n.d.                | +/n.d.                | +/+                  |
| Experimento 5 (11%/89%)                        | +/n.d.                | +/n.d.                | +/+                  |
| Experimento 6 (5%/95%)                         | +/n.d.                | +/n.d.                | +/+                  |
| Experimento 7 (0%/100%)                        | n.d.                  | n.d.                  | controle             |

n.d. = não detecção de bandas, incluindo a mistura MDBK/Vero.

#### IV. DISCUSSÃO

Estudos feitos por Nims et al. (1998) mostraram que a contaminação de células pode ser detectável pela técnica de eletroforese de isoenzimas, se representar pelo menos 10% da população total celular. Em nossos experimentos de mistura também ocorreu identificação de contaminação em torno de 10% da população para a isoenzima LDH, mas foi superior para as outras isoenzimas com identificação a partir de 5% da população celular. Algumas isoenzimas (LDH e MDH) foram mais facilmente detectáveis enquanto outras apresentaram dificuldades na análise, como a G-6-PDH e esterase, sendo assim necessário o uso de duas ou mais isoenzimas para melhor análise de contaminação. Markovic & Markovic (1998) citam também uma sensibilidade de 10% para a técnica de *DNA fingerprinting* e a cariotipagem com uma sensibilidade maior entre 1-5%, mas como uma técnica laboriosa e inapropriada em grande escala.

A ausência das bandas da esterase para as linhagens Vero e MDBK pode ser devido a uma concentração muito baixa dela que impossibilitou sua detecção *in situ* como relatou Ruddle & Rapola (1970). Esses autores observaram a necessidade de crescimento celular de uma semana das células para posterior coleta e identificação eletroforética da esterase. Tempo que as células estariam saindo da fase log e entrando na fase estacionária e que apresentariam uma maior concentração de isoenzimas da esterase. Uma outra mistura de Vero e MDBK foi feita, com uma coleta pós-cultivo semanal, mas mesmo assim manteve-se a ausência de bandas das isoenzimas da esterase para as duas células. Para averiguar a real possibilidade de uso da esterase na identificação de contaminação interlinhagens, procedeu-se a um novo experimento com uma mistura de células do par de linhagens detectáveis eletroforicamente, isto é, RK-13 e PK-15. Nessa mistura experimental adicional, RK-13/PK15, foi possível verificar a contaminação para ambas as células a partir de 5%, indicando que a esterase pode ser utilizada no estudo de contaminação de linhagens, desde que haja uma prévia identificação de sua presença nas linhagens.

A falta de reciprocidade na porcentagem de detecção da contaminação para uma mesma isoenzima e experimentos com a mesma quantidade de células das linhagens (Experimentos 2 e 3 frente aos Experimentos 5 e 6 na mistura RK-13/Vero, e Experimento 2 frente Experimento 6 na mistura MDBK/Vero e

isoenzima MDH) pode ter ocorrido por uma diferença na fase de crescimento celular das linhagens quando da etapa da coleta. A coleta foi feita após a formação completa da monocamada e, provavelmente, uma linhagem já estaria na fase estacionária e com maior concentração de isoenzimas (RK-13) e a outra (Vero) estaria no início da fase exponencial e menor concentração de isoenzimas. Essa discrepância ocorreu pois para cada linhagem houve uma variação de tempo dos dias pós-repique para que toda a monocamada estivesse completa (de 2 a 4 dias). Isto poderia justificar por que as células Vero não puderam ser visualizadas nas contaminações de 5% e 10% dos Experimentos exemplificados acima. Haveria uma baixa concentração destas isoenzimas nas células Vero, que não permitiu a visualização eletroforética e conseqüente contaminação experimental. Ainda mais que, por questões práticas laboratoriais, as misturas dos experimentos (Experimentos 1 a 7) nem sempre foram executadas todas na mesma ocasião. Sabe-se, por exemplo, que as cinco isoenzimas da LDH, por apresentarem concentrações diferentes dependendo do tecido, nem sempre todas são detectadas e visualizadas eletroforeticamente (FERNANDES e SIMONI, 1995).

No uso desse método de análise eletroforética de isoenzimas para o controle de qualidade de linhagens celulares, deve-se pré-estabelecer o período de coleta após repique e/ou realizar duas coletas em tempos diferentes e utilizar a concentração final de células estabelecida em Fernandes & Simoni (1995) de  $42 \times 10^6$ /ml. Desse modo, evita-se qualquer influência do período da fase de crescimento e concentração das isoenzimas.

Futuramente como prospecta Markovic & Markovic (1998) deve ser requerido dos autores de trabalhos baseados em culturas celulares, um certificado de análise de contaminação cruzada celular, CCC (cell cross-contamination), citando a revista *In vitro Cellular and Developmental Biology* como a pioneira na exigência dessa declaração.

## V. CONCLUSÃO

O monitoramento contínuo da pureza das linhagens celulares é importante e necessário para controle de qualidade. Além da conscientização por parte da comunidade científica que utiliza linhagens celulares como ferramenta de trabalho. A análise eletroforética de isoenzimas permite detectar possíveis contaminações interespecíficas de linhagens celulares ocorridas acidentalmente em laboratórios e pode ser utilizada neste controle de qualidade. O ideal é um conjunto de duas ou mais isoenzimas para resultados mais satisfatórios e confiáveis.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baffi, M. A.; Lino, G. R.; Pereira, C. D.; Bonetti, A. M. Perfil esterásico no desenvolvimento ontogenético do carrapato bovino *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, suplemento 3, 2003.

Cruz, A.S.; Figueiredo, C.A.; Barbosa, M.L.; Martinez, C.H.O.; Salles-Gomes, L.F. RC- IAL: Linhagem celular contínua de rim de coelho- características e substrato para replicação de vírus. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v.26, n.6, p.392-399, 1992.

Fernandes, M.J.B. & Simoni, I.C. Caracterização de linhagens celulares. I-Identificação de espécies por análise isoenzimática. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.62, p.59-63, 1995.

Halton, D.M.; Peterson, W.D.Jr.; Hukku, B. Cell culture quality control by rapid enzymatic characterization. *In Vitro*, Rockville, v.19, n.1, p.16-24, 1983.

Harbell, J.W.; Knootz, S.W.; Lewis, R. W.; Lovell, D. IRAG working group: Cell cytotoxic assays. *Food and Chem. Toxicol.*, Oxford, v.35, p.79-126, 1997.

Harris, H. & Hopkinson, D.A. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam: North-Holland, 1976.

Hay, R. J. *Methods for authenticating cell lines* *Dev. Biol. Stand.*, Basel, v.76, p.25-37, 1992.

Kozak, R. W. Introduction to the issues: recently developed methods for characterizing cell lines. *Dev. Biol. Stand.*, Basel, v.76, p.21-4, 1992.

Markovic, O. & Markovic, N. Cell cross- contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, Basel, v.34, n.1, p.1-8, 1998.

Nelson-Rees, W. A.; Daniels, D. W.; Flandermeyer, R.R. Cross-contamination of cells in culture. *Science*, Washington, v.212, p.446-452, 1981.

Nims, R.W.; Shoemaker, A.P.; Bauernschub, M.A.; Rec, L.J.; Harbell, J.W. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, Columbia, v.34, n.1, p.35-39, 1998.

Novokhatskii, A.S.; Tsareva, A.A.; Mikhailova, G.R.; Zhdanov, V.M. Contamination of continuous cell lines. *Vopr Virusol, Russia*, v.4, p.432-439, 1980.

Parodi, B.; Aresu, O.; Bini, D.; Lorenzini, R.; Schena, F.; Visconti, P.; Cesaro, M.; Ferrera, D.; Andreotti, V.; Russon, T. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method. *Biotechniques, Natick*, v.32, n.2, p.432-40, 2002.

Ruddle, F. H.; Rapola, J. Changes in lactate dehydrogenase and esterase-specific activities, isozymic patterns, and cellular distribution during the growth cycle of PK cells in vitro. *Experimental Cell Research, Duluth*, v.59, p.399-412, 1970.

Silva, L. M.; Montes de Oca, H.; Diniz, C. R.; Fortes-Dias, C. L. Fingerprinting of cell lines by directed amplification of minisatellite-region DNA (DAMD). *Braz. J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto*, v.34, p.1405-1410, 2001.

Simoni, I.C.; Fernandes, M.J.B.; Custódio, R.M.; Madeira, A.M.B.N.; Arns, C.W. Susceptibility of cell lines to avian viruses. *Rev. Microbiol., São Paulo*, v30, p.373-376, 1999.

Soteriou, B.; Fisher, R.A.; Khan, I.M.; Kessling, A.M.; Archard, L.C.; Buluwela, L. Conserved gene sequences for species identification: PCR analysis of the 3' UTR of the son gene distinguishes human and other mammalian DNAs. *Forensic Sci. Int., Limerick*, v.73, n.3, p.171-178, 1995.

Stacey, G.N. Standardization in animal cell technology. *Folia Microbiol (Praha), Prague*, v.42, n.2, p.113-116, 1997.

Steube, K.G.; Grunicke, D.; Drexler, H.G. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., Washington*, v.31, n.2, p.115-119, 1995.

Stulberg, C.S.; Peterson, W.D.Jr.; Simpson, W.F. Identification of cells in culture; *Am. J. Hematol., New York*, v.1, n.2, p.237-242, 1976.

Tsareva, A.A.; Glinskikh, N.P.; Dreizin, R.S.; Kolesnikova, G.G.; Zhdanov, V.M. Isoenzyme characteristics of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase of continuous cells from the collection of the Sverdlovsk Research Institute of Virus Infections. *Vopr Virusol, Russia*, v.5, p.620-623, 1976.