





Control contaminació

M02. Tècniques complementàries
als cultius cel·lulars





Una CONTAMINACIÓ pot ser visible o no,
destructiva o no, però sempre tindrà efectes
adversos



Contaminacions

- Efectes adversos sobre el metabolisme cel·lular
- Qualitat dels resultats experimentals pobre
- Pèrdua de cèl·lules valioses
- Pèrdua de productes cel·lulars
- Pèrdua de temps, diners i esforç

Com s'introdueix la contaminació?

- Operador
- Manipulació
- Atmosfera
- Superfícies
- Utensilis
- Medis i solucions



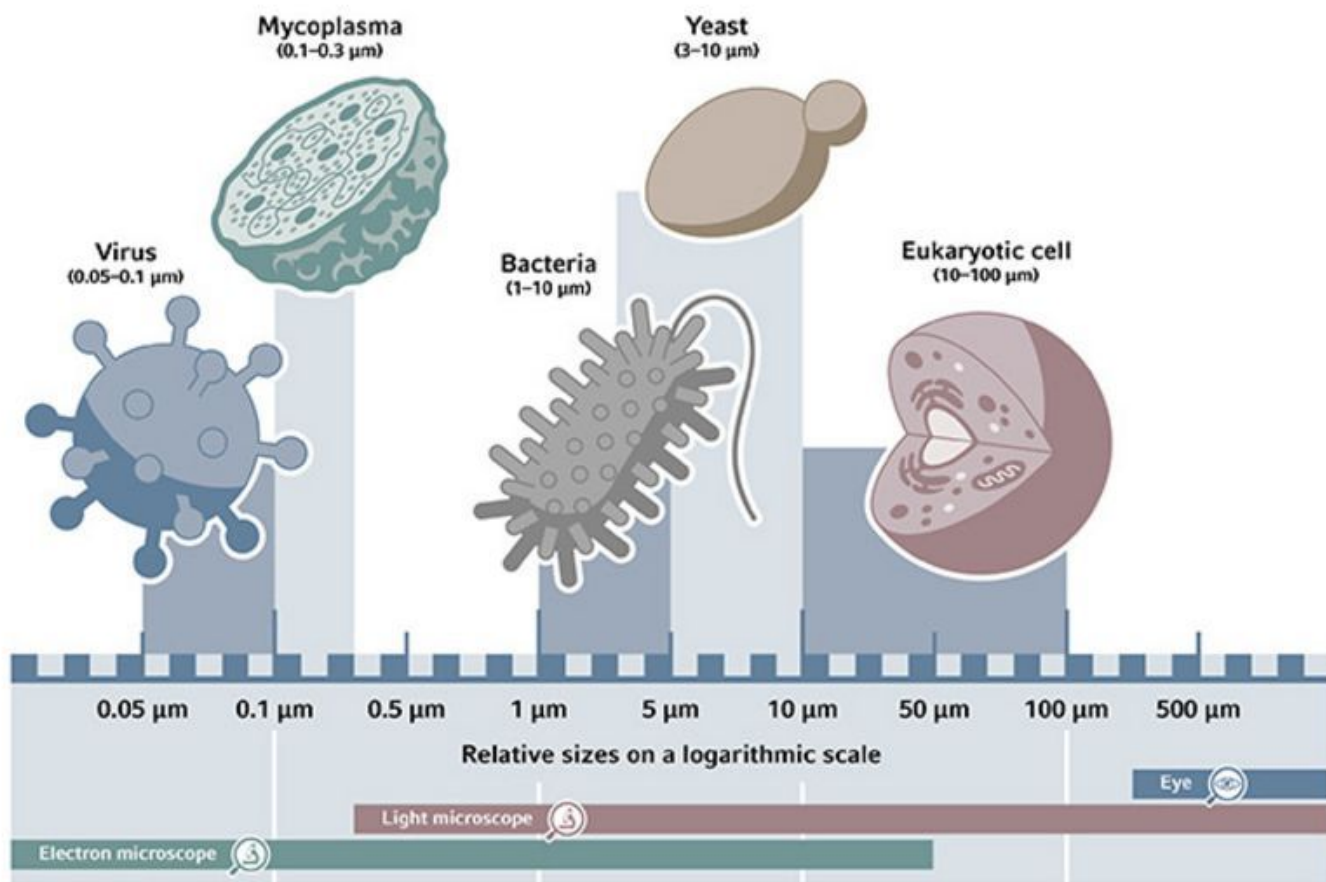
Bona pràxis

Asèpsia

Factors

- A. NO BIOLÒGICS-QUÍMICS:
 - a. Impureses en el medi, serum o aigua
 - b. Endotoxines, plastificants i detergents
 - c. Ordre, neteja, vestimenta adequada, etc.

- B. BIOLÒGICS:
 - Fongs
 - Virus
 - Bacteris
 - **Micoplasmes**
 - Contaminació creuada



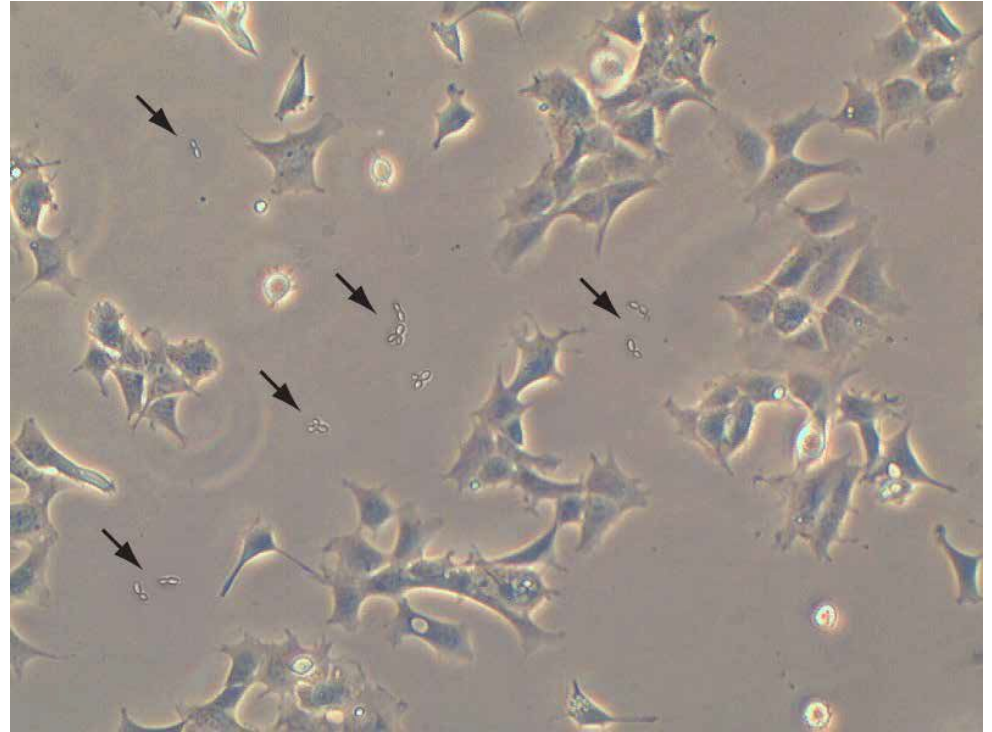
Fungi - Llevats

Microorganismes eucariotes que poden arribar als 40 μ m. Partícules rodones o ovaides formant cadenes.

Detecció:

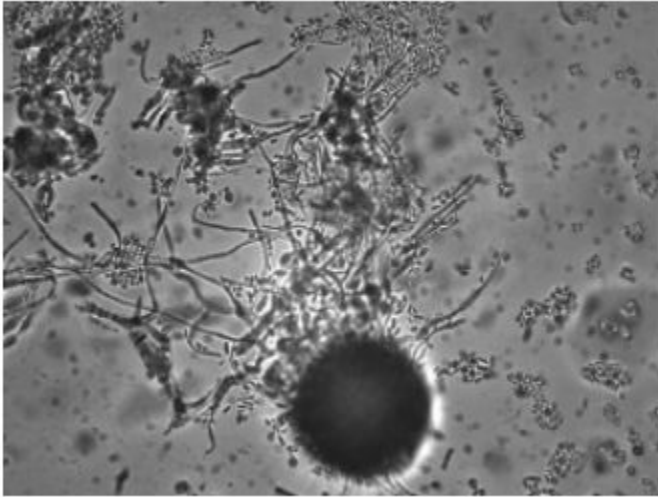
Fàcils de detectar a microscopia, ja que es tornen tèrbols.

El pH canvia, augmenta, quan ja ens trobem en un estat avançat de contaminació.



Simulated phase-contrast images of 293 cells in an adherent culture that is contaminated with yeast. The contaminating yeast cells appear as ovoid particles, budding off smaller particles as they replicate.

Fungi - Floridures (Moho)



Microorganismes eucariotes que generen filaments multicel·lulars (hifes). Generen micel·les

Detecció:

- Observables a simple vista
- Terbolesa
- Augment del pH quan el cultiu es troba molt infectat
- És difícil detectar les espores

Control: Funguicides

Virus

Diffícils de detectar degut a la seva mida.

solen haver-hi poques contaminacions ja que són uns microorganismes amb requeriments molt específics pels hostes.

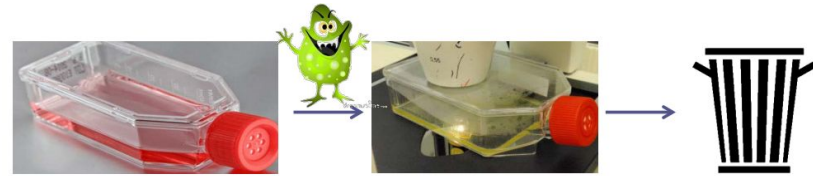
Però s'ha d'anar amb compte! Perquè poden no afectar al cultiu cel·lular però si al personal del laboratori.

Bacteris

Microorganismes unicel·lulars (~ 2µm)

Com els detectem?

- Fàcils de detectar a microscopia
- Canvis en el pH del medi, disminucions
- *"Cloudy and with a thin film on the surface"* - turbidesa



Control

- Penicilina/estreptomicina, gentamicina → PERÒ DE MANERA TEMPORAL

Bacteris

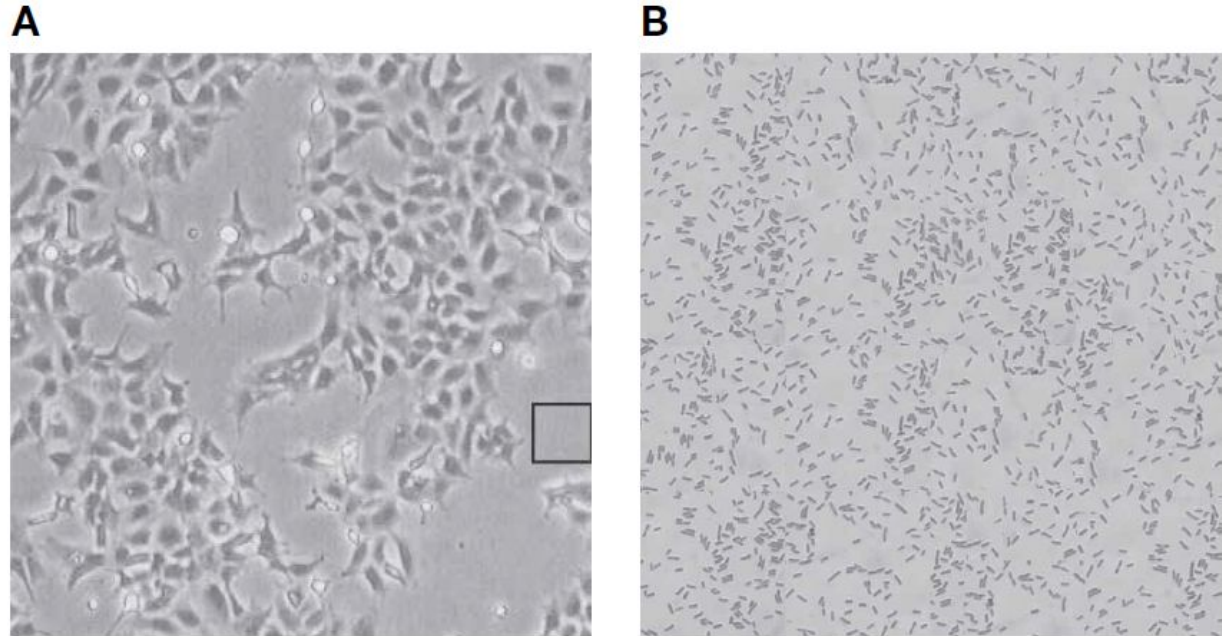


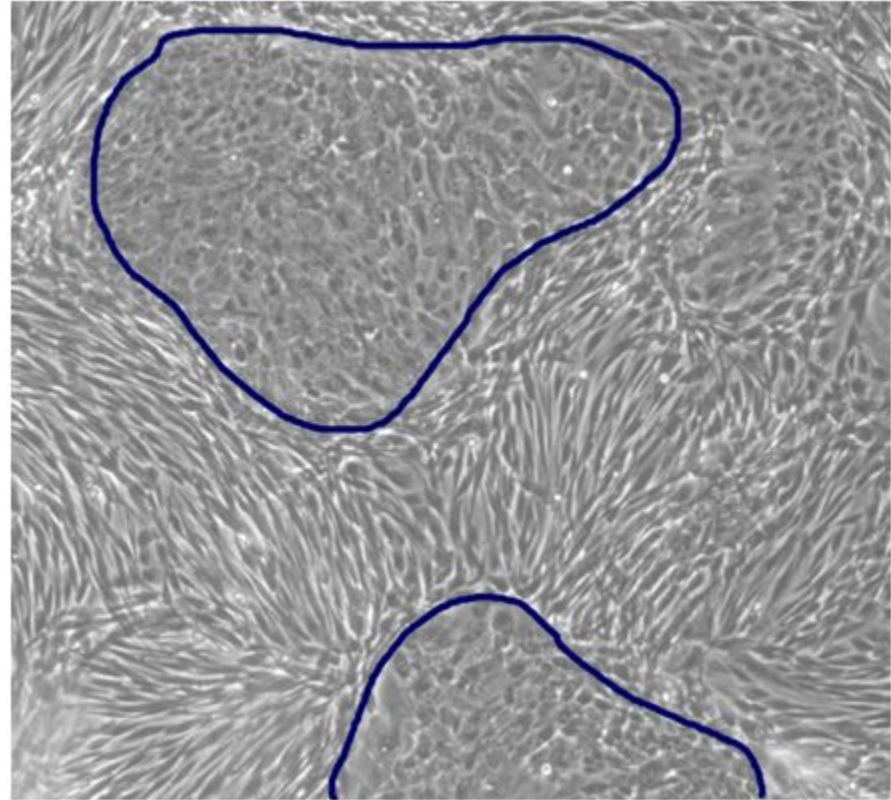
Figure 2.2. Simulated phase-contrast images of adherent 293 cells contaminated with *E. coli*. The spaces between the adherent cells show tiny, shimmering granules under low power microscopy, but the individual bacteria are not easily distinguishable (panel A). Further magnification of the area enclosed by the black square resolves the individual *E. coli* cells, which are typically rod-shaped and are about 2 μm long and 0.5 μm in diameter. Each side of the black square in panel A is 100 μm .

Contaminació creuada - *cross contamination*

Contaminació amb altres cèl·lules eucariotes del laboratori

Control:

- Revisar periòdicament les característiques de la línia cel·lular
- Bona pràctica asèptica
- DNA fingerprinting
- Anàlisi cariotip
- Anàlisi isotip



Micoplasmes

Els cultius primaris solen estar lliures de micoplasmas, però moltes de les línies cel·lulars contínues estan infectades

Cèl·lules procariotes petites (0,3 a 0,5 μm de diàmetre, màxim 1 μm) que poden formar petites colònies.

No posseeixen paret cel·lular i per això només són capaces de créixer en medis determinats.

Poden no causar la mort del cultiu, però si canvis en:

- Comportament i creixement cel·lular
- Metabolisme
- Síntesi d'àcids nucleics
- Aberracions cromosòmiques
- Antigenitat de la membrana (alterar susceptibilitat vírica)

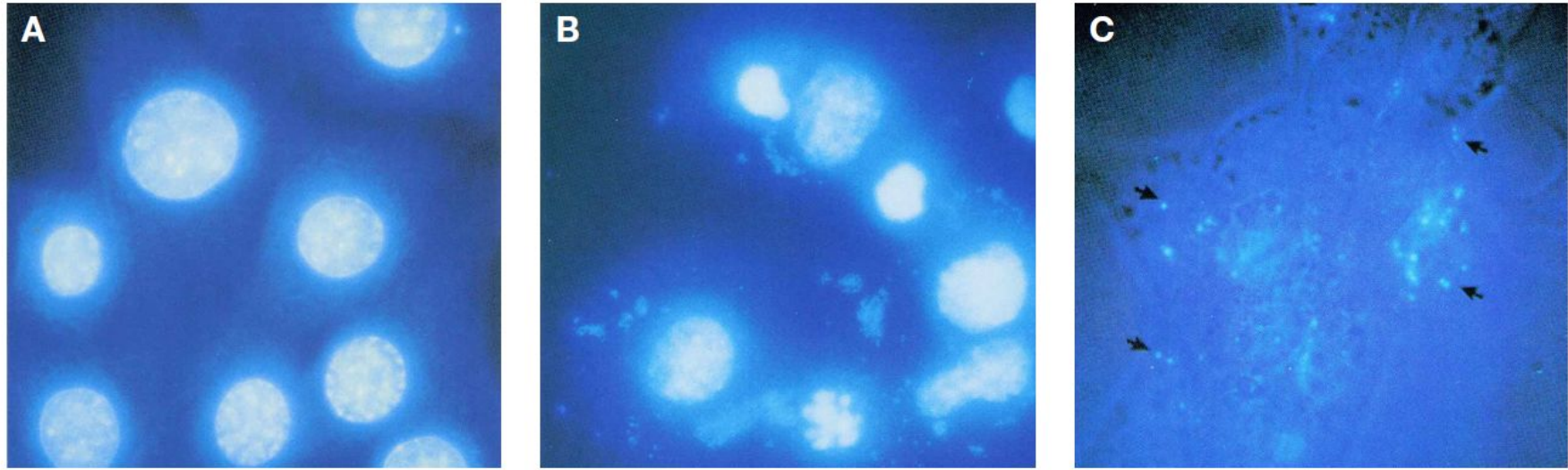


Figure 2.4. Photomicrographs of mycoplasma-free cultured cells and cells infected with mycoplasma. The cultures were tested using the Invitrogen™ MycoFluor™ Mycoplasma Detection Kit, following the kit protocols. **(A)** In fixed cells, the MycoFluor reagent has access to the cell nuclei, which are intensely stained with the reagent, but the absence of fluorescent extranuclear objects indicates that the culture is free from mycoplasma contamination. **(B)** In fixed cells infected with mycoplasma, the MycoFluor reagent stains both the nuclei and the mycoplasma, but the intense relative fluorescence of the nuclei obscures the mycoplasma on or near the nuclei. However, the mycoplasma separated from the bright nuclei are readily visible. **(C)** In live cells, the MycoFluor reagent does not have access to the nuclei, but readily stains the mycoplasma associated with the outside of cells. The emission spectrum of the control included in the kit is designed to have a homogeneous intensity that closely matches that of mycoplasma stained according to the MycoFluor mycoplasma detection protocol, allowing researchers to discriminate between stained mycoplasma and other forms of background luminescence, including viruses, bacteria, and cellular autofluorescence. The images were obtained using 365 nm excitation and a 100/1.3 Plan Neofluar™ objective lens coupled with a 450 ± 30 nm bandpass filter.

Ús d'antibiòtics

- Development of antibiotic-resistant bacterial strains.
- Low-level contaminations with partially resistant bacteria which are difficult to detect.
- Longer periods of cultivating cells harboring undetected contaminations increase the risk of spreading the contamination throughout the lab.
- Mycoplasma infections may take hold more easily due to the absence of any visible signs of contamination as well as longer cultivation periods.
- A false sense of security may foster poor aseptic technique.
- Antibiotics can have adverse effects on the metabolism of eukaryotic cells.

Tècniques per detectar micoplasma

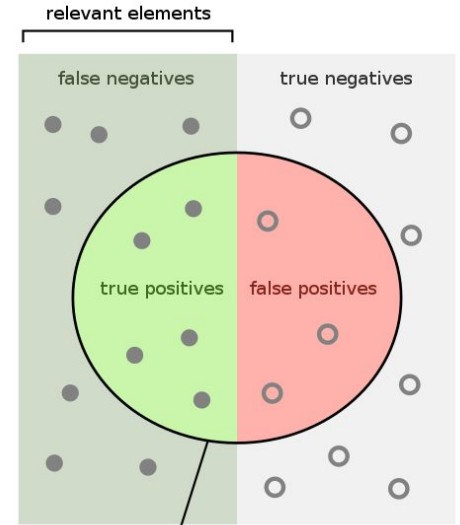
Sensibilitat i Especificitat

La **sensibilitat** ens indica la capacitat del nostre estimador per donar com a casos positius els casos realment malalts, o proporció de malalts correctament identificats.

$$\text{Sensibilitat} = \frac{VP}{VP + FN}$$

L'**especificitat** ens indica la capacitat del nostre estimador per donar com a casos negatius els casos realment sans; o proporció de sans correctament identificats.

$$\text{Especificitat} = \frac{VN}{VN + FP}$$



selected elements

How many relevant items are selected?
e.g. How many sick people are correctly identified as having the condition.

How many negative selected elements are truly negative?
e.g. How many healthy people are identified as not having the condition.

Sensitivity =

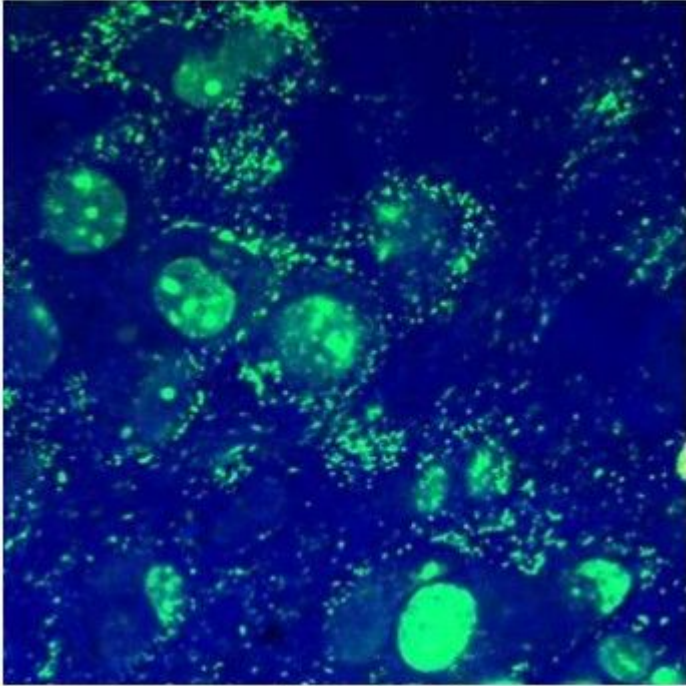
Specificity =

1. Mètodes estàndard: cultius específics

- Medis de cultiu específics
- Relativament lent, necessiten entre dos i quatre dies per créixer
- No totes les espècies de micoplasma són cultivables
- Alta sensibilitat i especificitat



2. Mètodes indirectes: per tinció d'ADN



Tinció de DNA (Hoechst o DAPI) que s'uneix tant a les cèl·lules en cultiu com al material genètic del micoplasma.

La lectura dels resultats no és senzilla, i pot ser subjectiva.

Baixa sensibilitat i baixa especificitat.

3. Tècniques de biologia molecular (PCR o qPCR)

Amplificació de regions d'RNAr (26S o 16S)

Mètode ràpid i eficaç, alta sensibilitat.

Especificitat mitjana, no detecta totes les espècies.

Pot donar falsos positius si hi ha contaminació que s'arrossega en els controls, medis, sueros, etc.

La PCR detecta quantitats mínimes d'ADN que ja no són viables

4. Mètodes bioquímics per colometria

Detecció d'antigens característics per ELISA

- Ràpid i barat
- Podem analitzar elevades quantitats de mostres
- Especificitat i sensibilitat mitjana

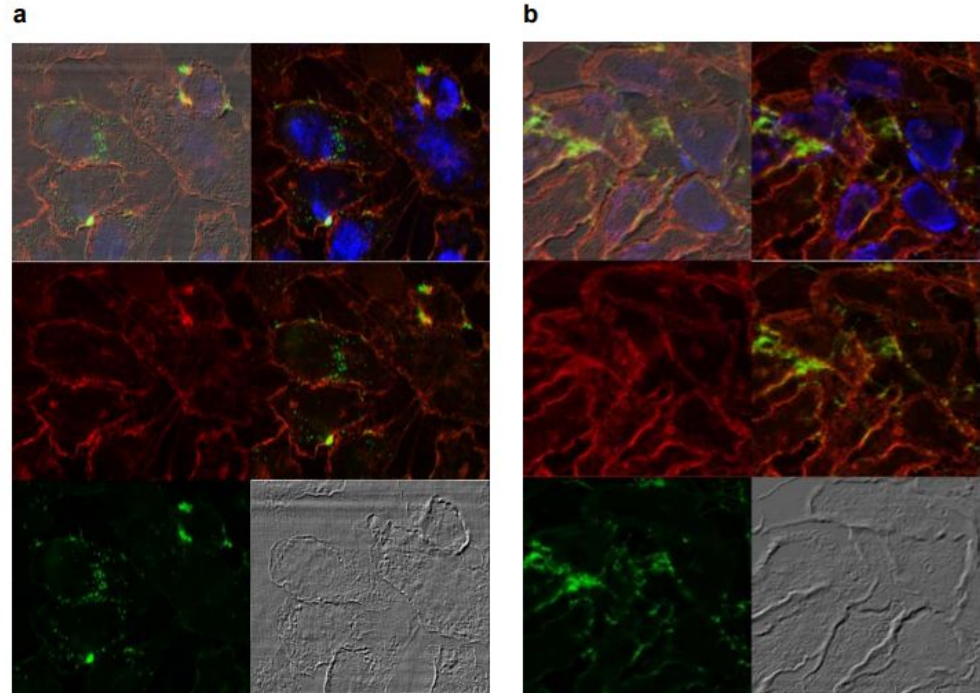
Assajos d'activtat enzimàtica per generació d'ATP, detectats per luciferasa

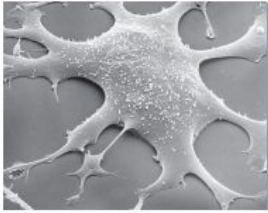
5. Altres

- Microscopia electrònica
- Hibridació d'ADN: **FISH**

Poc utilitzats, per complexitat i temps de processament

Figure 4: Fluorescence in situ hybridization (FISH). FISH (green) combined with membrane staining (red) and nuclei staining (blue) of (a) HELA infected with *M. fermentans*, and (b) HELA infected with *M. orale* applying a confocal laser microscope. Note the localization of the mycoplasmas in the cytoplasm of the eukaryotic cells in (a) and the colocalization of the mycoplasmas and the eukaryotic cell membrane in (b).





Mycoplasma Detection Methods

| Method | Sensitivity | Specificity | Advantages | Disadvantages |
|---|---------------------------------------|--|--|---|
| Microbiological culture | High ↑ | High ↑ | European Pharmacopeia recommended method. Gives a clear result. | Requires specialist microbiology lab. Relatively slow detection method. Potential source of cross-contamination. Some strains are not culturable. |
| Direct DNA stain | Low ↓ | Low ↓ (non-specific DNA stains) | European Pharmacopeia recommended method. Rapid and cheap. | Reading and interpretation of result can be difficult and subjective. |
| Indirect DNA stain (using indicator cells) | High ↑ | Low ↓ (non-specific DNA stains) | Amplifies contaminant so it is easier to interpret than direct stain. | Slower and more time consuming than direct stain |
| PCR | High ↑ | Medium ↔ (will not detect all Mycoplasma species) | Rapid and very sensitive. Several commercial kits available. | Risk of false positive results due to carry over contamination from positive controls and/or samples. |
| ELISA | Medium ↔ (high if amplified ELISA) | Medium ↔ (will not detect all Mycoplasma species) | Rapid and cheap. Useful and simple for testing large numbers of samples. | Amplified ELISAs include additional steps and are slower. Requires access to ELISA reader. |
| Biochemical detection | Medium ↔ | High ↑ | Very rapid. Useful for urgent testing of small sample numbers. | Requires access to luminometer. |

- No observables a microscopía óptica
- No causan efectos notorios
- Test específicos para detectarlos
- Pueden causar cambios en
 - Características del crecimiento celular
 - Metabolismo celular
 - Síntesis de ácidos nucleicos
 - Aberraciones cromosómicas
 - Antigenicidad en la membrana celular
 - Alterar la susceptibilidad a virus
- Validez de los experimentos cuestionable cuando menos
- Control:
 - No responden a tratamiento con antibióticos
 - Gentamicina y Kanamicina inhiben crecimiento ??

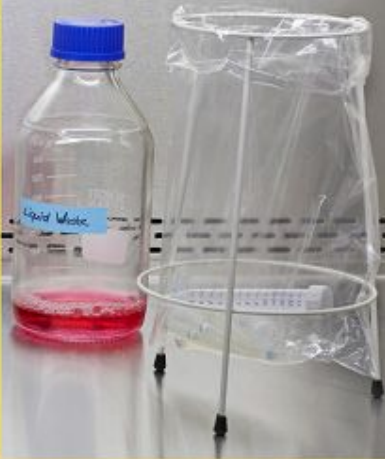
Clean space



Working space



Waste



clean

dirty