

Formazione interdisciplinare su attività di sanità animale presso le  
strutture di Biotecnologie e Diagnosi delle Malattie Virali

# Introduzione alle Colture Cellulari

Parte seconda

20 Novembre 2018



*Annalisa Altigeri*



# COLTIVARE....





## **CRITICITA'**

- Senescenza
- Perdita di caratteri biologici (crescita anomala e cambiamento morfologia? Diminuita sensibilità ai virus?.....)
- Contaminazione (da microrganismi, da altri tipi cellulari)
- Condizioni di coltura variabili

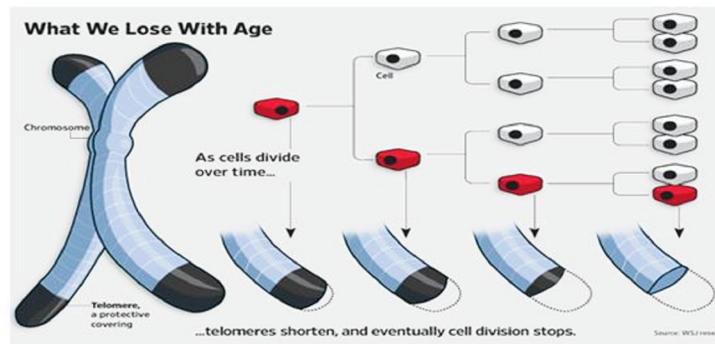
*Disporre di una õriservaö delle linee cellularií í ..*



## Lunghezza dei telomeri e invecchiamento



I telomeri si accorciano fisiologicamente ad ogni ciclo di divisione



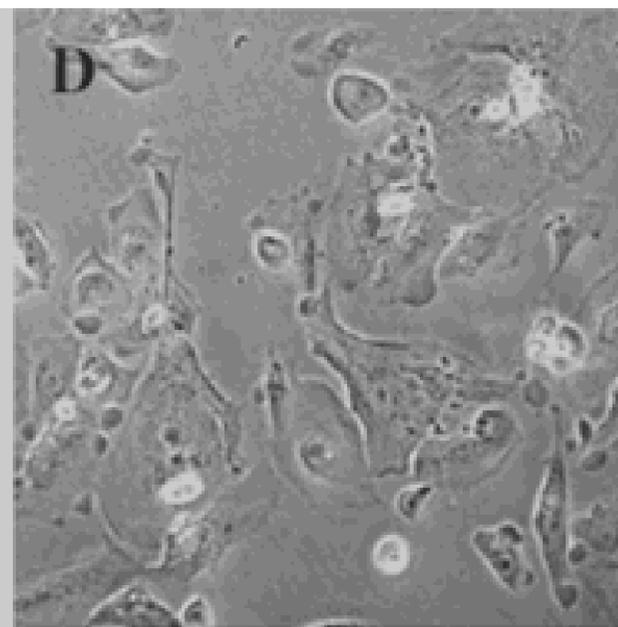
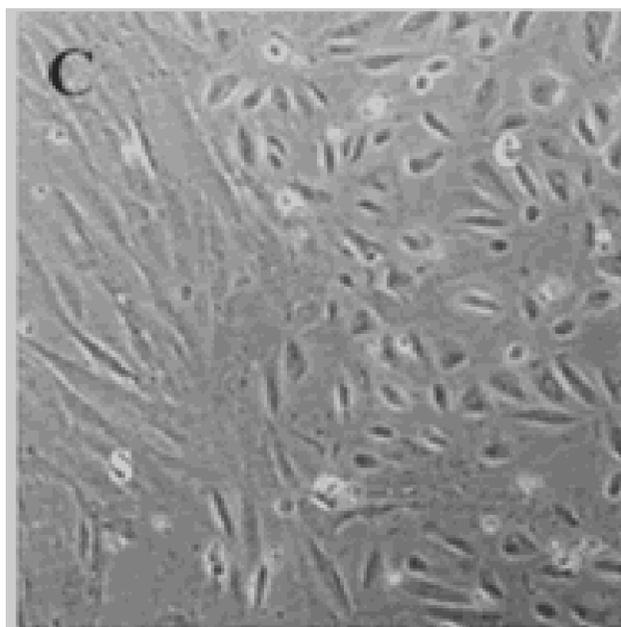
**La lunghezza dei telomeri di una cellula riflette la sua storia replicativa**

Al di sotto di una certa soglia si attivano specifici pathway che portano all'arresto della proliferazione cellulare e alla senescenza cellulare





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



## *Contaminazione da microrganismi*

### BATTERI E FUNGHI

*Contaminazione ad alta velocità e ben visibile*

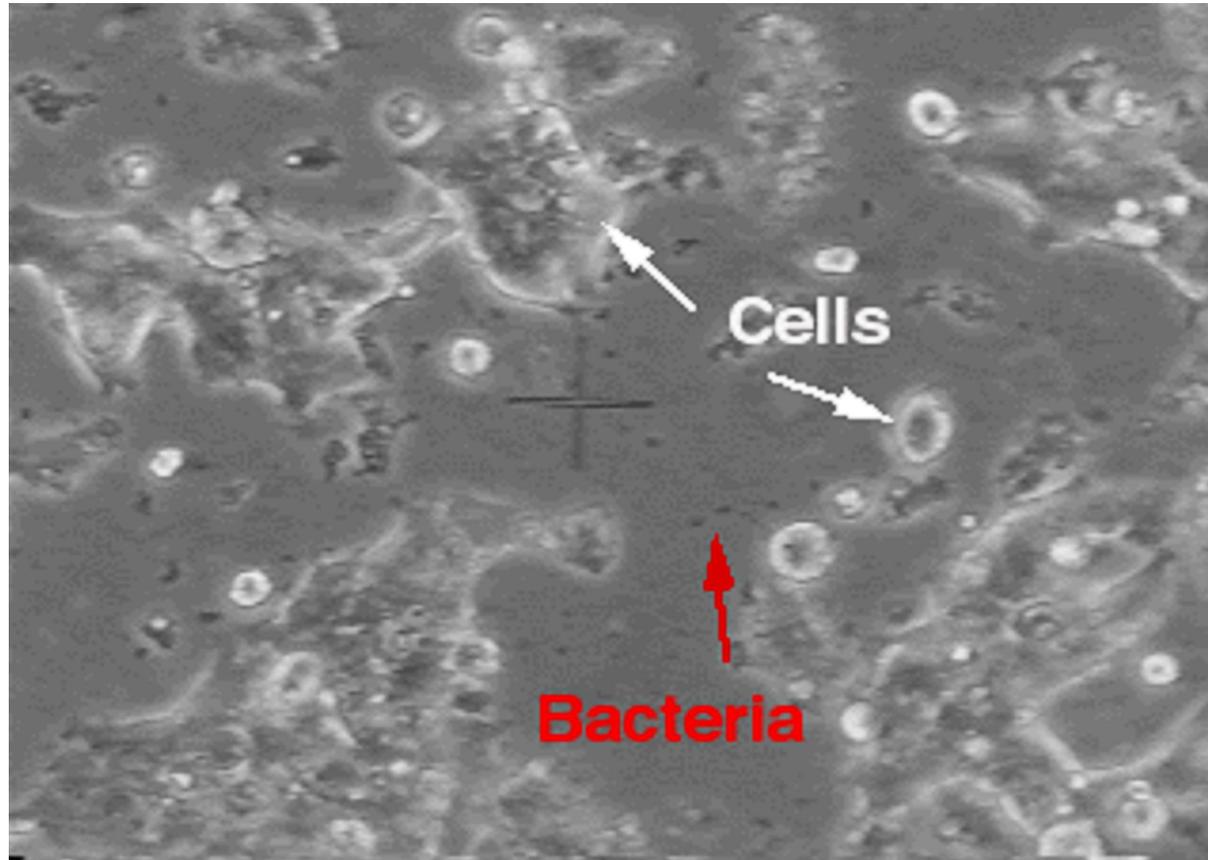
*Addizione di antibiotici e anti-fungini nel terreno di coltura conferiscono protezione generica*

***Si preferisce eliminare il prima possibile la coltura contaminata***



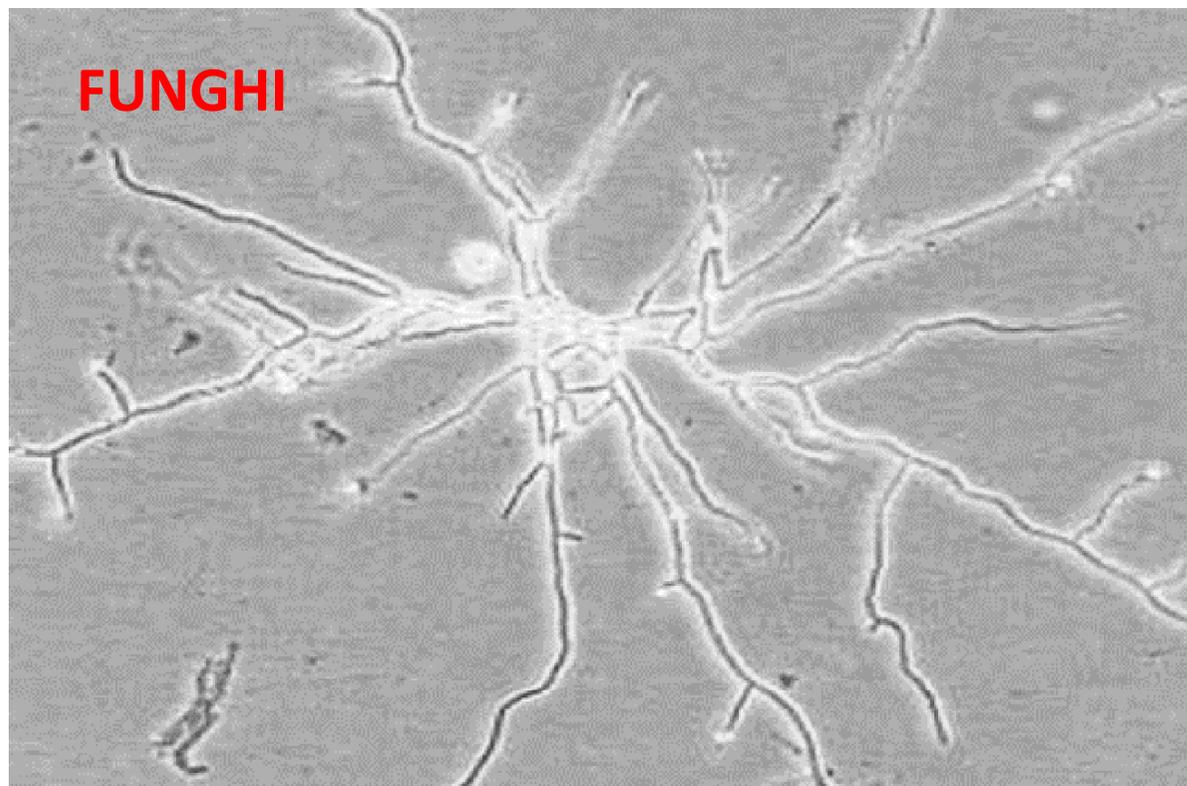


Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



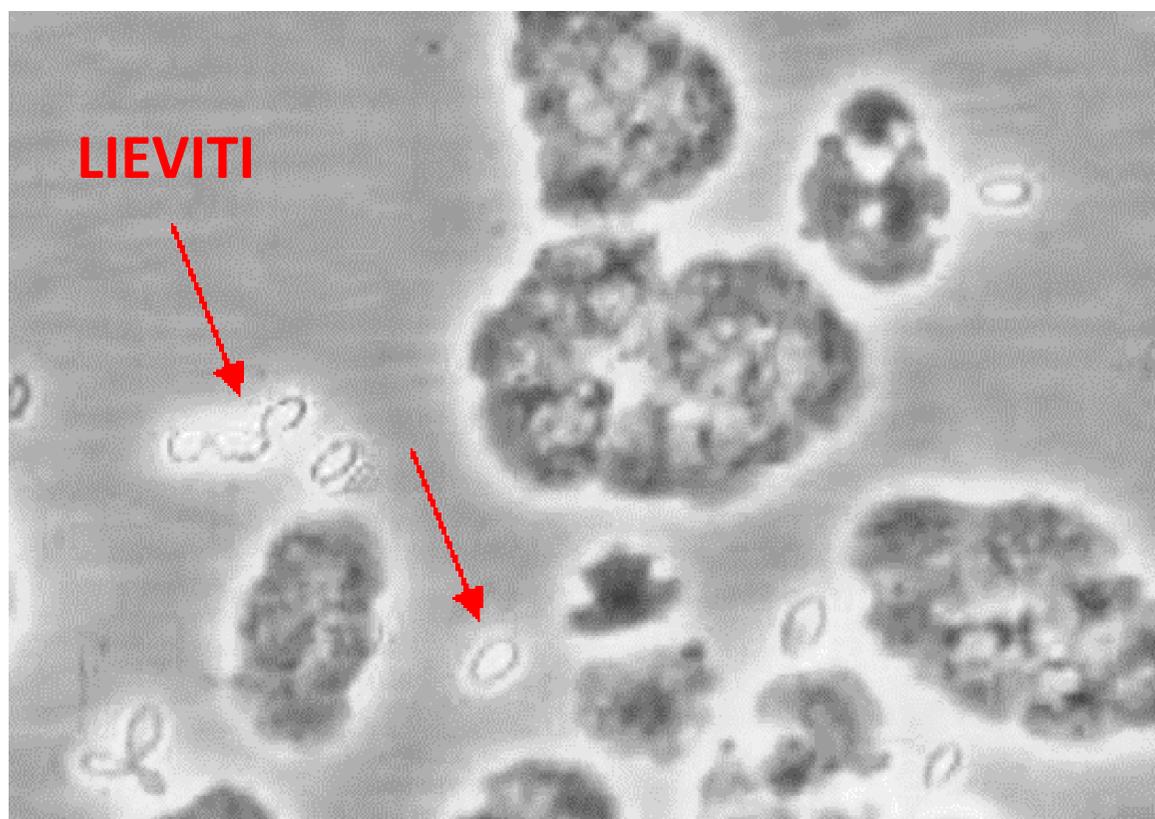


Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



## *Contaminazione da microrganismi*

### *VIRUS*

*Rara*

*Lisi massiva delle cellule con foci di  
trasformazione ma anche integrazione  
nel genoma della cellule ospite senza dar  
segno.*

***Non può essere eradicata***





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Non osservabili al  
microscopio  
rovesciato

## *Contaminazione da microrganismi*

### MICOPLASMI

*Microrganismo intracellulare obbligato che risiede nel citoplasma delle cellule eucariotiche*

*Conseguenze sul metabolismo cellulare evidenti in tempi lunghi*

### RILEVAMENTO DELLA CONTAMINAZIONE:

Coloranti acidi nucleici (Hoechst, arancio di acridina)

ELISA

PCR di specifiche sequenze di gDNA





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## CONTAMINAZIONE DA MICOPLASMI

### Quando eseguire il test?

- *Tutte le volte che nuove cellule entrano in laboratorio*
- *A seguito di modifiche di caratteristiche cellulari*
- *In caso di problemi di riproducibilita' degli esperimenti*
- *Random per valutare lo stato di tutte le cellule in coltura*

**POSSIBILITA' DI TRATTARE LE CELLULE CON MYCOPLASMA REMOVE AGENT (MRA)**





## **STERILITA'**

I filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) e la tecnologia del flusso laminare hanno reso possibile la realizzazione di **CAPPE STERILI**.

Viene garantita la protezione delle cellule e dell'operatore.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# **STERILITÀ**

## **PRECAUZIONI:**

*"Dpi*

*"Uso corretto di cappe e incubatori*

*"Decontaminare superfici di lavoro*

*"Monitorare sterilità terreni e reagenti*

*"Plastica monouso*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

*Le cellule animali possono essere  
veicolo di malattie, e il pericolo  
cresce quanto più le cellule  
provengono da specie animali affini  
alla nostra (primati).*

Basso rischio=linee continue non umane e linee umane diploidi ben caratterizzate

Medio rischio=linee poco caratterizzate

Alto rischio=colture primarie, linee con patogeni endogeni, linee infettate

**Adeguato contenimento e procedure sempre rispettate**





## Contaminazione con altri tipi cellulari

- Avviene quando si lavora contemporaneamente con più linee
- Si ha inizialmente una popolazione mista e in seguito solitamente un tipo cellulare prevale

***Manipolare un solo tipo cellulare alla volta***





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Disporre di una riserva delle linee cellulari ..**

# **BIOBANCA**

**Assicurare qualità costante**

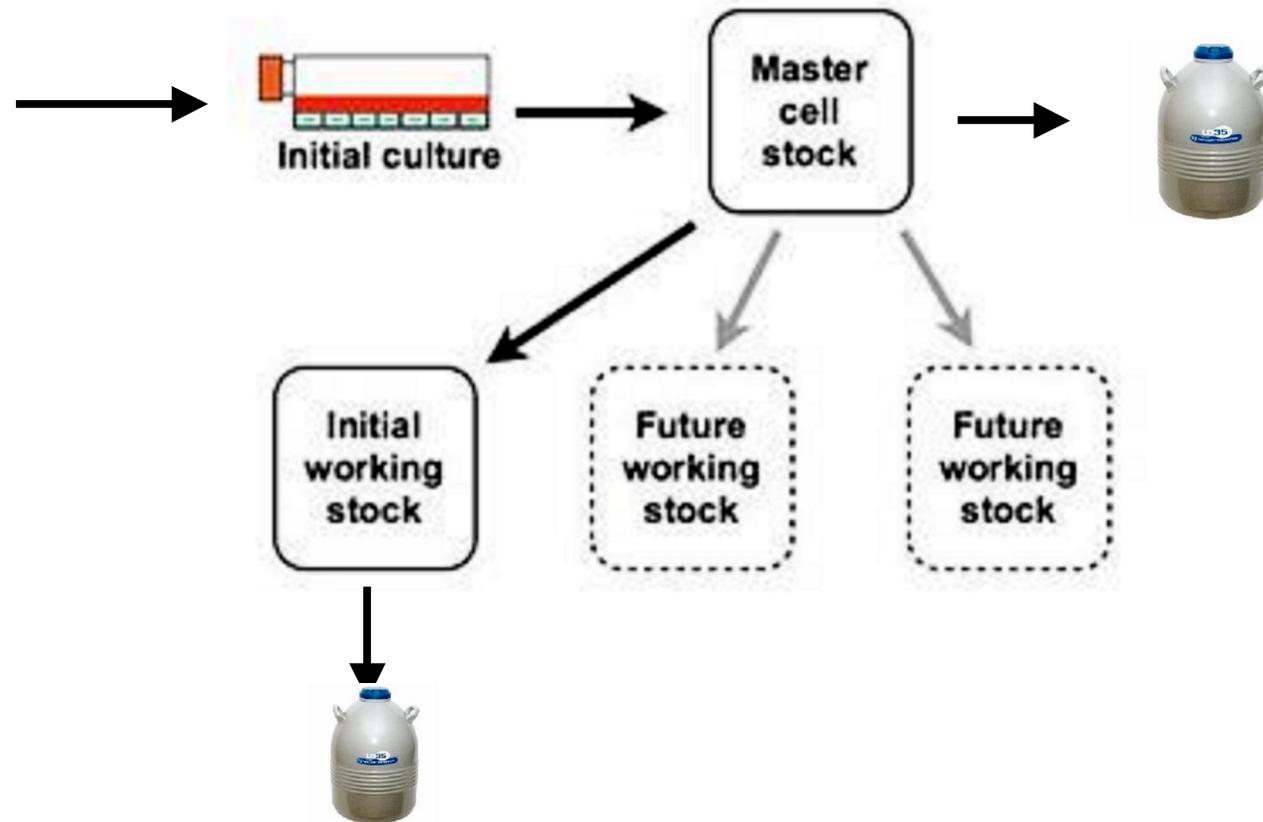
**Esperimenti eseguiti ad un numero di passaggi comparabili**

**Caratteri biologici preservati**





- ATCC: American Type Culture Collection
- DSMZ: German Collection of microorganism and cell culture
- ECACC: European Collection of Animal Cell Culture
- IZS





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## ***CRIOCONSERVAZIONE***



VELOCITA' DI  
CONGELAMENTO  
1°C/minuto

SCONGELAMENTO RAPIDO

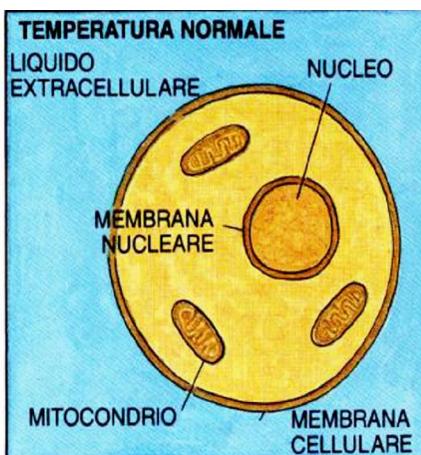
CELLULE IN FASE DI  
CRESCITA LOGARITMICA

**Le cellule possono essere criopreservate in azoto liquido a –  
196°C per piu di 10 anni**



# CONGELAMENTO

Il congelamento deve essere fatto in modo da non danneggiare la cellula. Per questo si deve formare nella cellula del ghiaccio amorfo, non cristallino che può rompere la membrana.



**Crioprotettore: DMSO**





## PROCEDURA

- Tripsinizzare le cellule in adesione o raccogliere le cellule in sospensione
- Determinare il numero di cellule e la vitalità
- Centrifugare sospensione cellulare ed eliminare il surnatante
- Preparare il terreno di congelamento:terreno di coltura+ 10%DMSO
- Risospendere il pellet nel medium di congelamento rapidamente ed in ghiaccio
- Aliquotare in cryovials (concentrazione frequentemente utilizzata  $4 \times 10^6$ cells/ml)

1 . Inizia il congelamento1 1 1





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Immediato trasferimento delle cryovials in contenitori  
contenenti isopropanolo a  $-80^{\circ}\text{C}$

**Velocità di  
raffreddamento di  
 $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$**

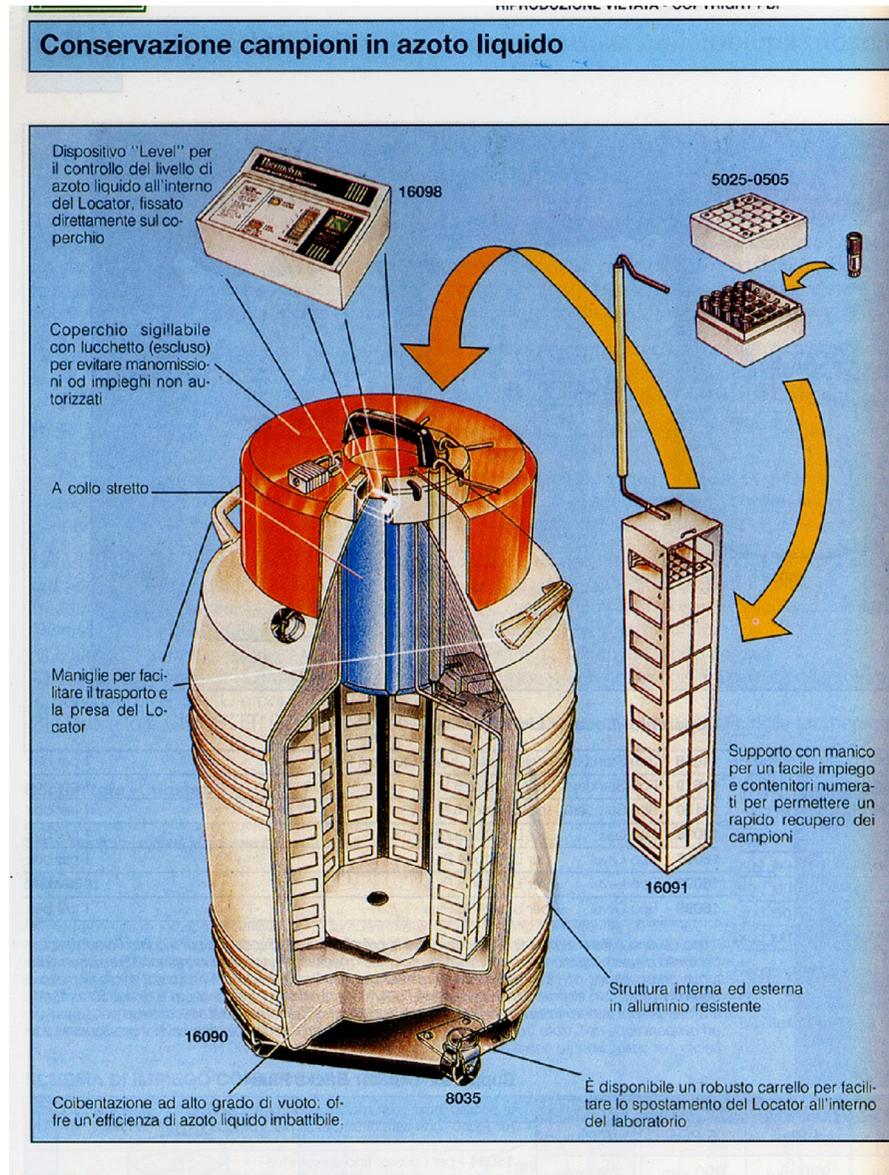




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Le cellule vengono  
conservate in bidoni  
di azoto liquido.

**Sistema di registrazione  
ed archiviazione!!!!**



## SCONGELAMENTO

Le cellule vanno scongelate rapidamente immergendole in un bagno a 37 °C.

Dato che il DMSO puo' essere potenzialmente tossico, e' bene eliminarlo dal terreno di coltura.



í .Scongelamento rapidoí í í





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## PROCEDURA

- Scongellare le cellule.
- Trasferirle in una Falcon da 15 mL sterile contenente 10 ml di terreno e risospendere delicatamente.
- Centrifugare a 250 g x 10 min
- Eliminare il sopranatante e risospendere in terreno di coltura fresco.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Per approfondimenti.....

**PG VIR 004 rev 4 GESTIONE AREE E ATTIVITA' PER COLTURE CELLULARI**

**POS VIR 001 SUP rev 2 Allestimento coltura primaria**

**POS VIR 002 SUP rev 5 Allestimento subcoltura cellulare crescita monostrato**

**POS VIR 003 SUP rev 2 Allestimento subcoltura cellulare crescita sospensione**

**POS VIR 004 SUP rev 4 Conteggio cellule in una sospensione**

**POS VIR 005 SUP rev 3 Congelamento tessuti tripsinizzati**

**POS VIR 006 SUP rev 5 Congelamento colture cellulari**

**POS VIR 007 SUP rev 3 Scongelo tessuti tripsinizzati e colture cellulari**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Cosa faremo in laboratorio...

1. *Com'è organizzato il nostro laboratorio di colture cellulari.*
2. *Come appaiono al microscopio rovesciato cellule vive, adese alle base della piastra di*
3. *Coltura.*
4. *Come cambia la morfologia delle cellule quando le stacciamo dalla piastra mediante*
5. *il trattamento enzimatico.*
6. *Conta cellulare al microscopio ottico mediante l'ausilio della camera di Burker*
7. *Distribuzione sospensioni cellulari a concentrazione nota*
8. *Congelamento di una linea cellulare*
9. *Scongelamento di una linea cellulare.*



 In vitro veritas. 

**Grazie.....**

***Annalisa Altigeri***

