

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





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

COLTIVARE....





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



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

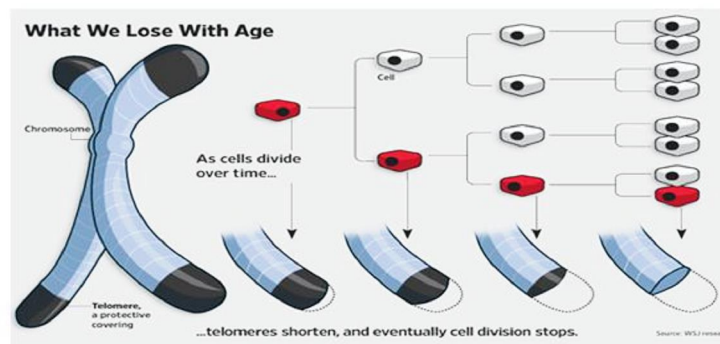
Disporre di una õrìservaö delle linee cellularií í ..



Lunghezza dei telomeri e invecchiamento



I telomeri si accorciano fisiologicamente ad ogni ciclo di divisione



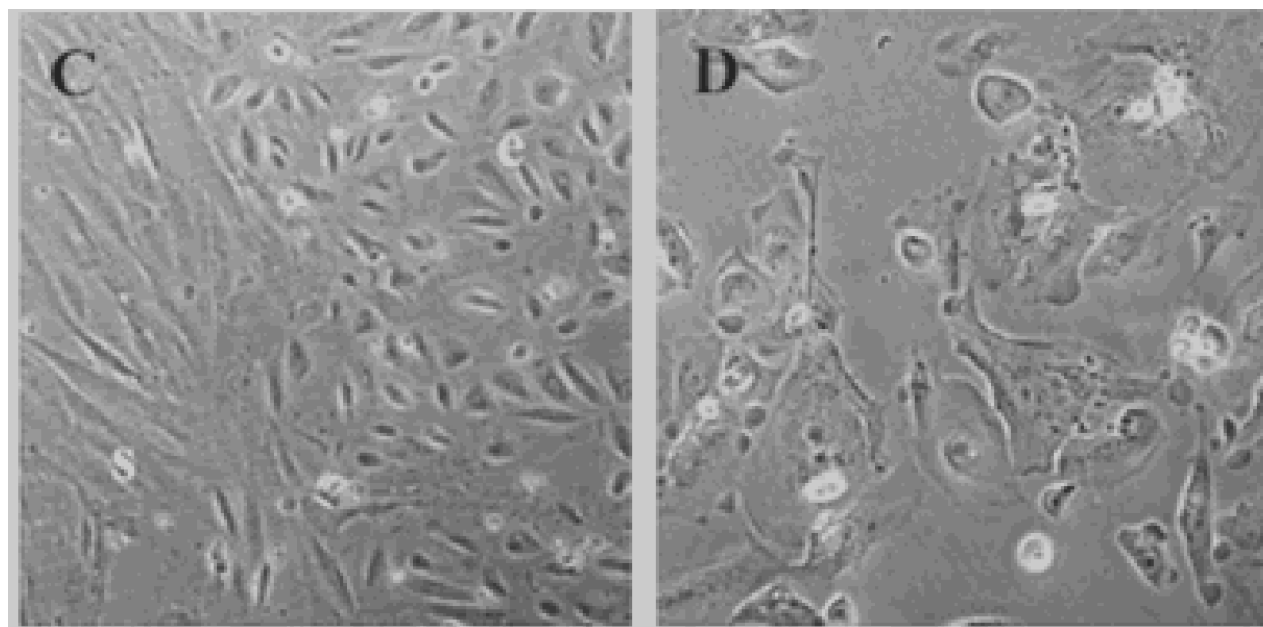
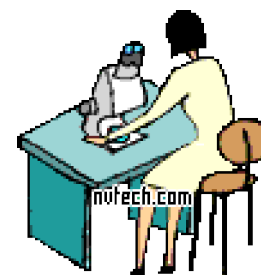
La lunghezza dei telomeri di una cellula riflette la sua storia replicativa

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

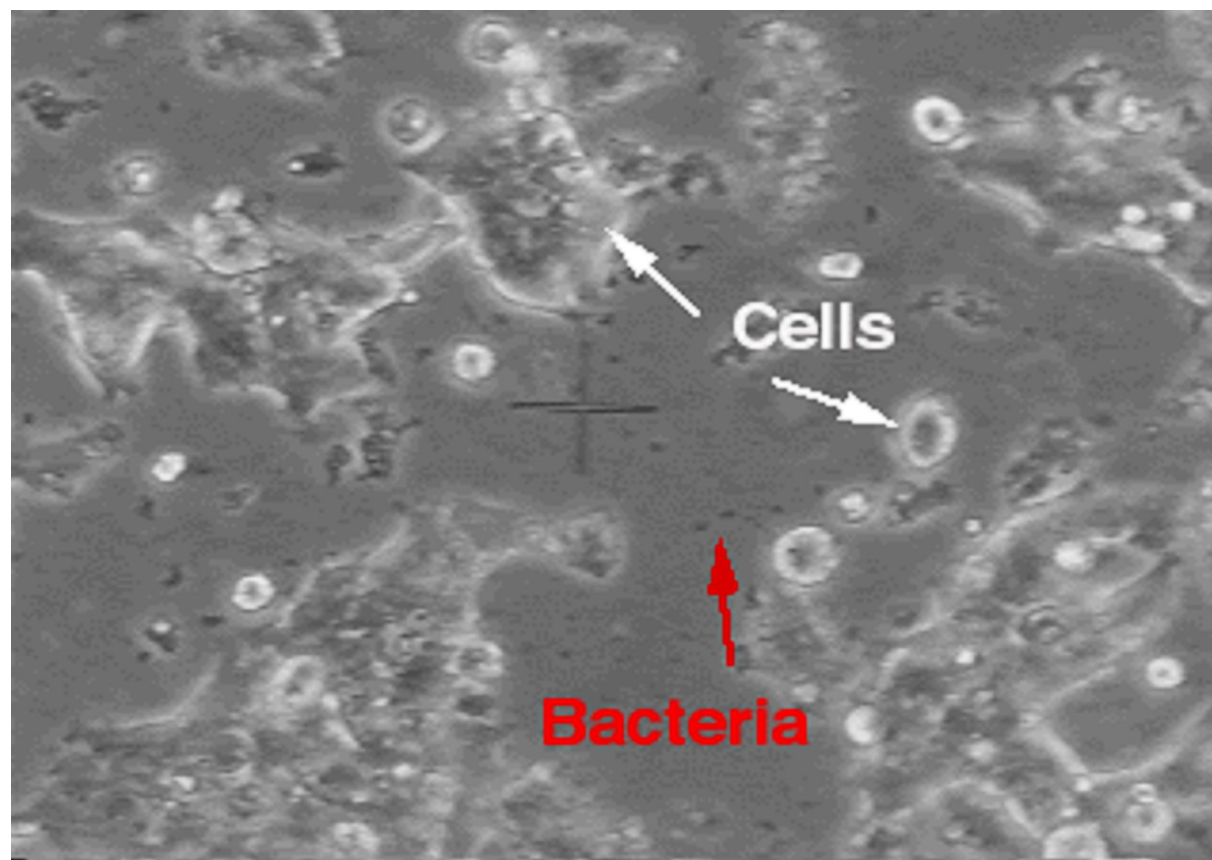
*Addizione di antibiotici e anti-fungini nel terreno
di coltura conferiscono protezione generica*

*Si preferisce eliminare il prima possibile la coltura
contaminata*





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

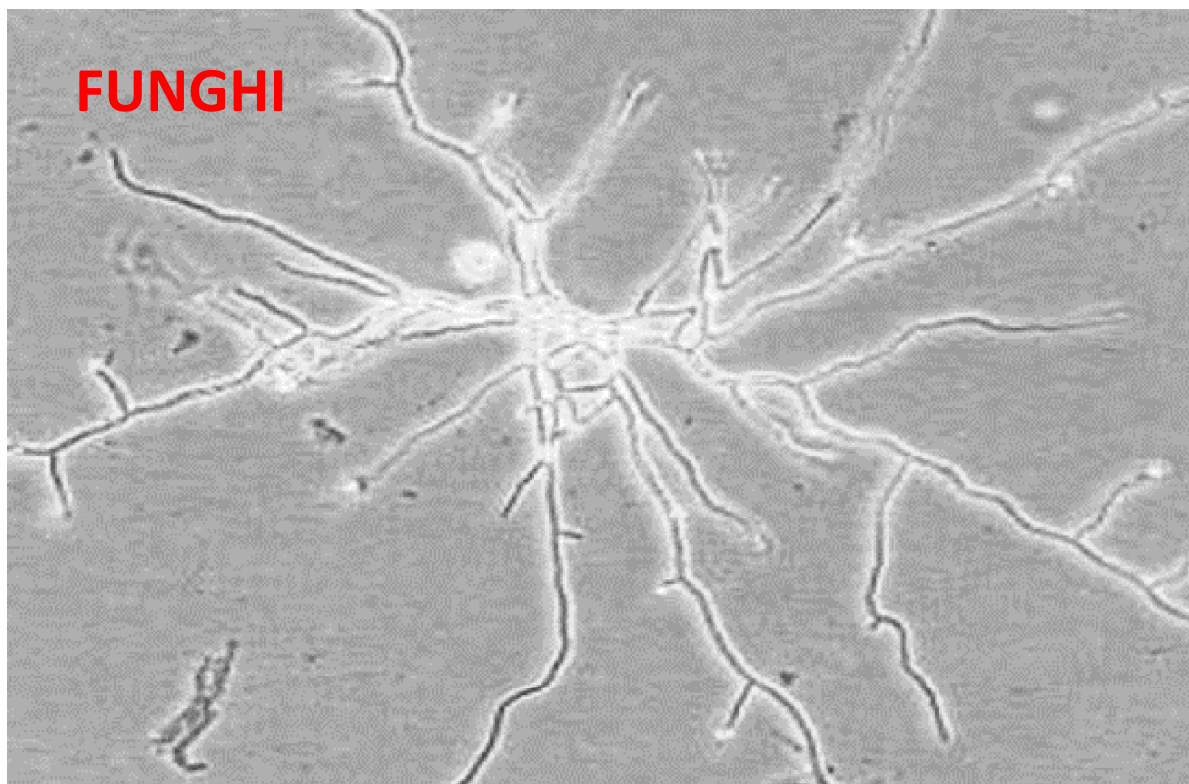




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

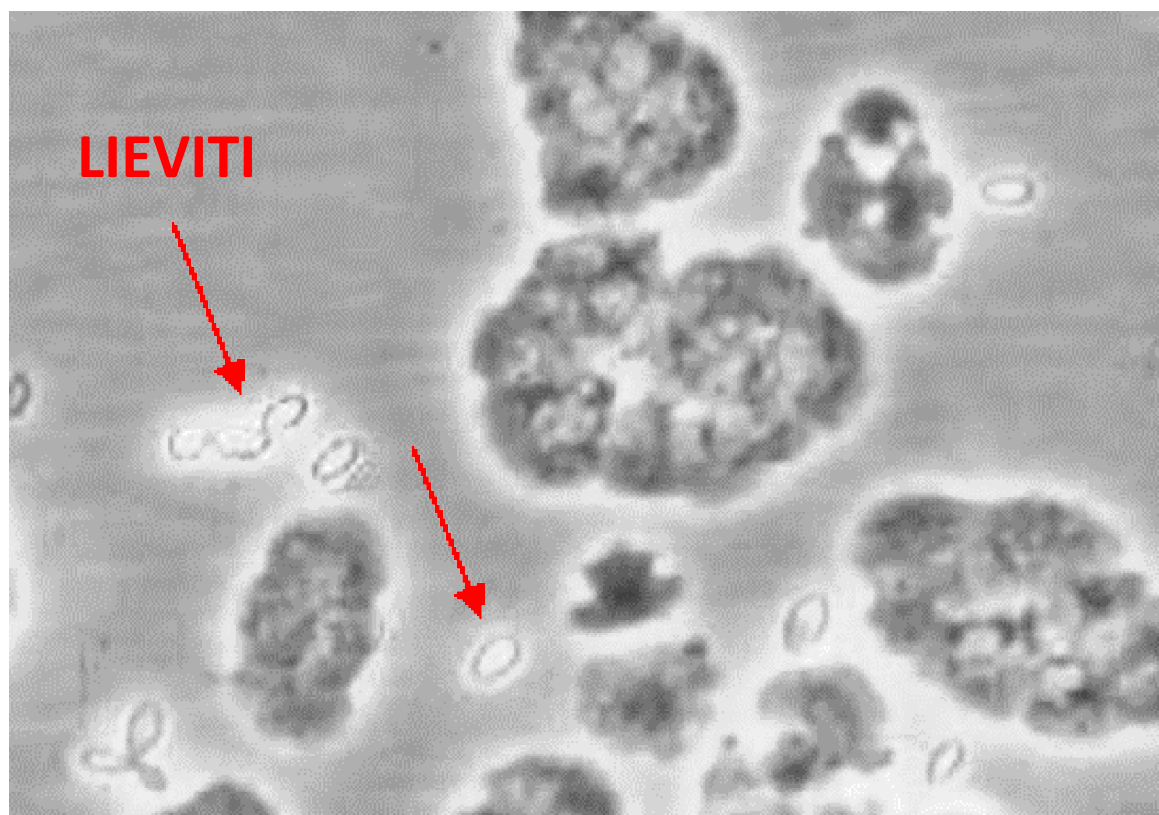


FUNGHI





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)



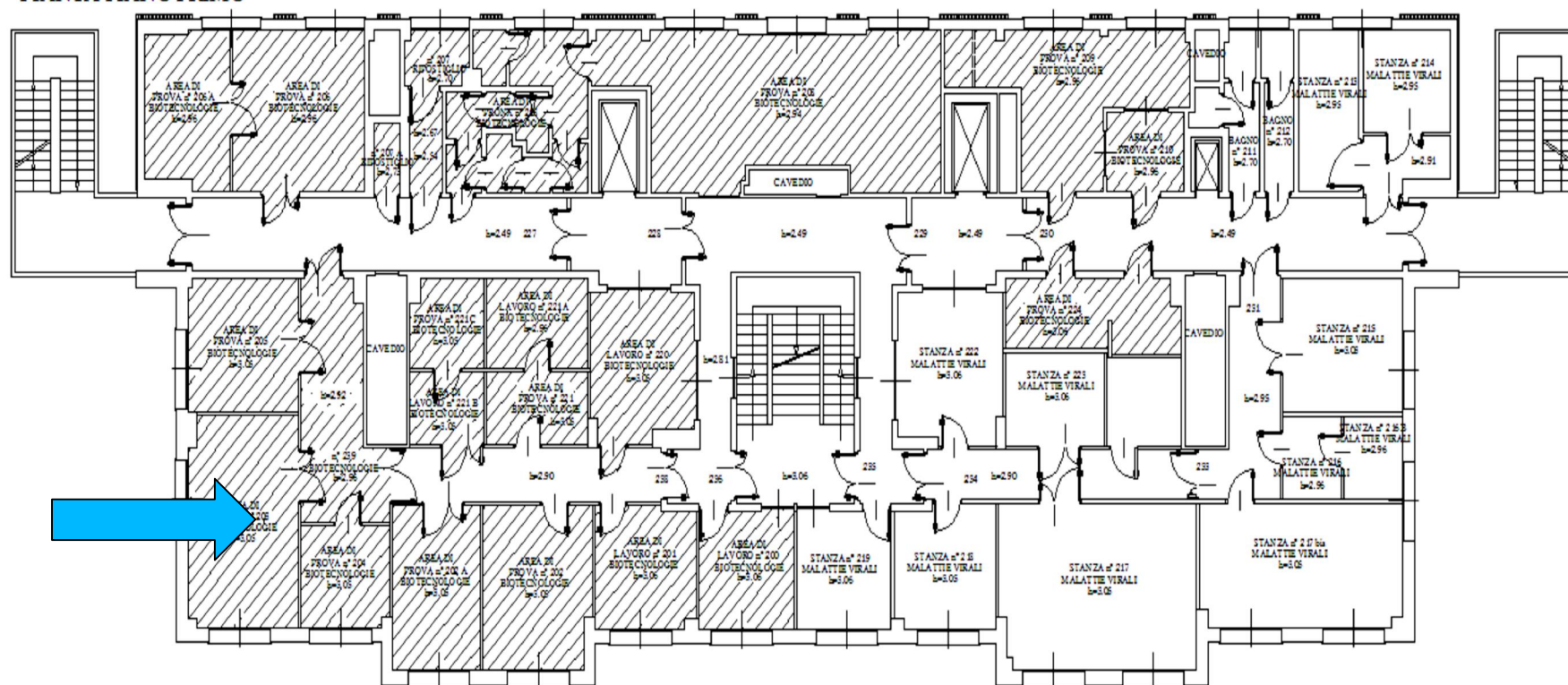


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

STERILITA'

Si destina un solo laboratorio alle colture cellulari

EDIFICIO 4
PIANTA PIANO PRIMO



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.



STERILITA \emptyset

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

Adeguate contenimento e procedure sempre rispettate





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



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 qualita' costante

Esperimenti eseguiti ad un numero di passaggi comparabili

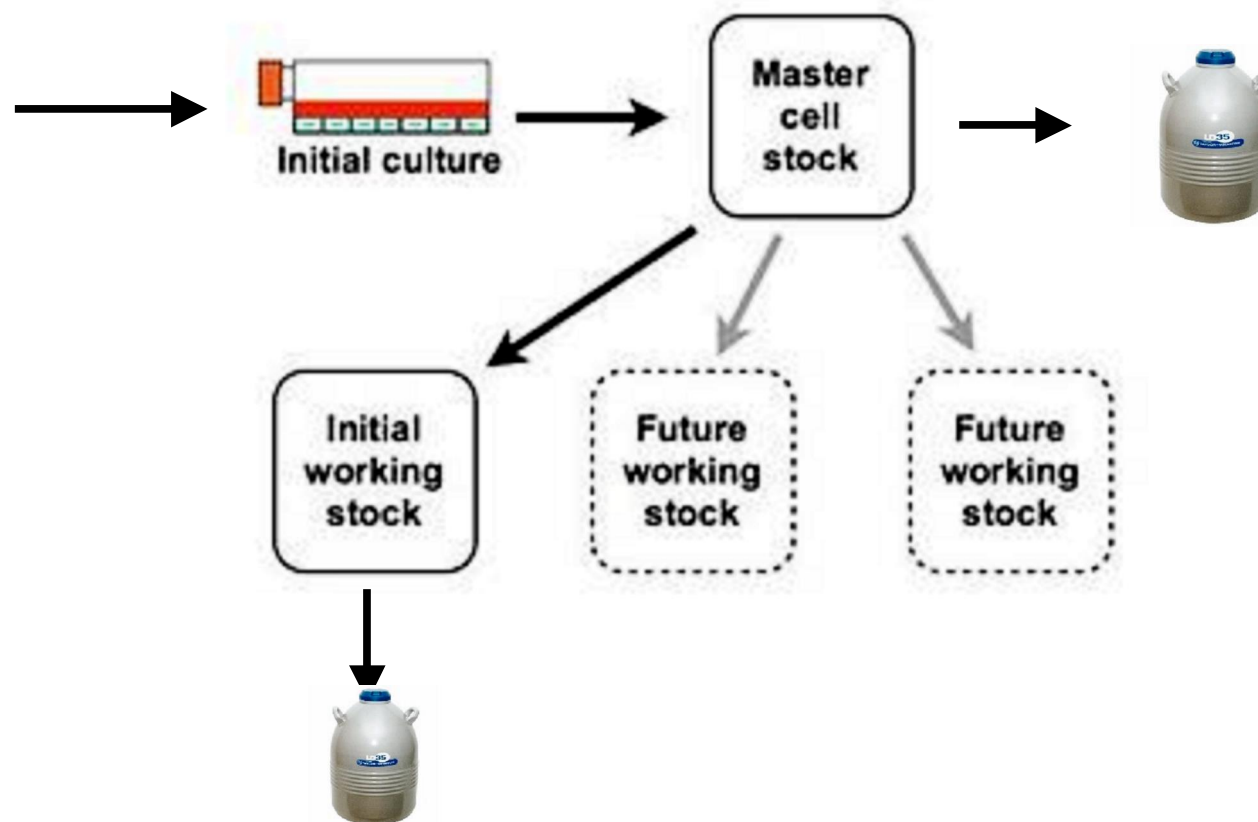
Caratteri biologici preservati





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

- 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

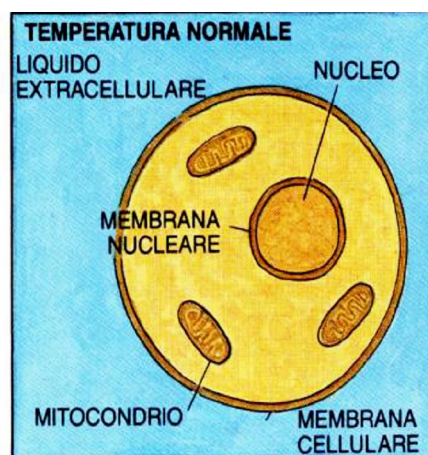
CELLULE IN FASE DI
CRESCITA LOGARITMICA

**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





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

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 4×10^6 cells/ml)

1 . Inizia il congelamento1 1 1



Immediato trasferimento delle cryovials in contenitori
contenenti isopropanolo a -80°C

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

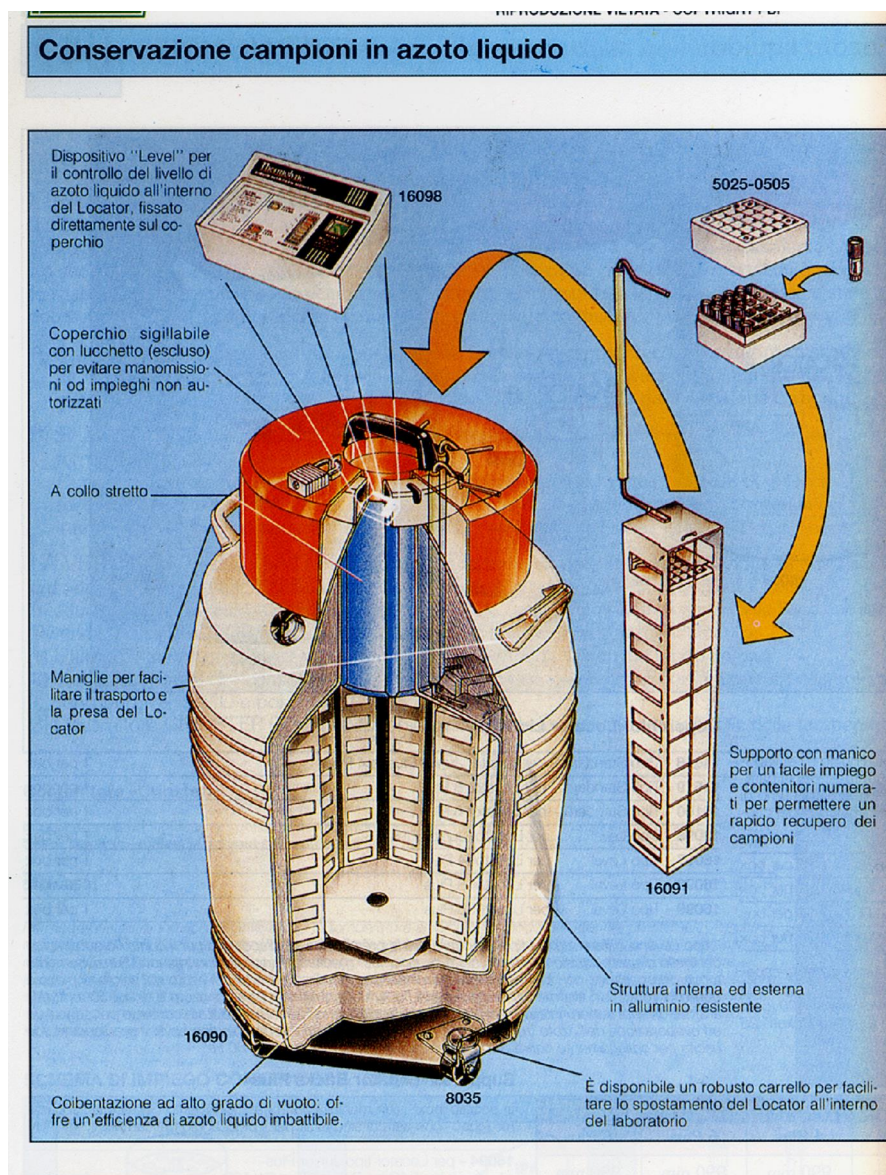




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

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 può essere potenzialmente tossico, è bene eliminarlo dal terreno di coltura.



í .Scongelamento rapidoí í í



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.



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



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.*





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



In vitro veritas.



Grazie.....

Annalisa Altigeri

