



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



3. ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Νικόλαος Μπαλατσός

Μολύνσεις κυτταροκαλλιεργειών

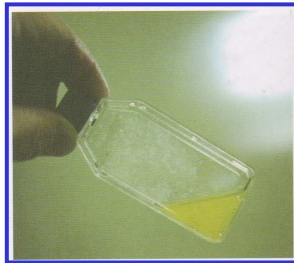
- Βακτήρια
- Μύκητες (fungus)
- Μυκόπλασμα (mycoplasma)
- Ζύμη (yeast)

Βακτήρια

- Σφαιρικά (κόκκοι, cocci)
- Βάκιλλοι (bacilli)
- Σπιρίλια (spirilla)

Δεν διακρίνονται εύκολα σε μικρή μεγένθυση (~100X)
διακριτά σε μεγαλύτερες (400X)

Μη ομοιογενής κοκκιώδης περιοχή ανάμεσα στα κύτταρα
Λεπτό υμένιο στην επιφάνεια του υλικού
Εκκρίνουν τοξίνες βλαβερές για τα κύτταρα.

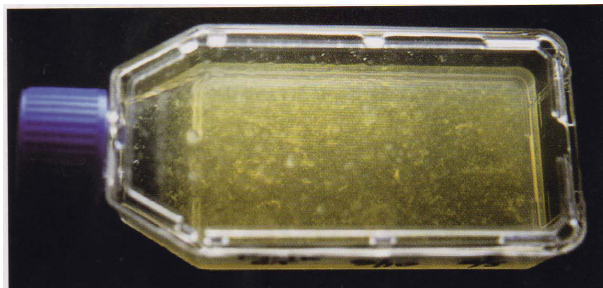


Βακτήρια

Απότομη αλλαγή pH.

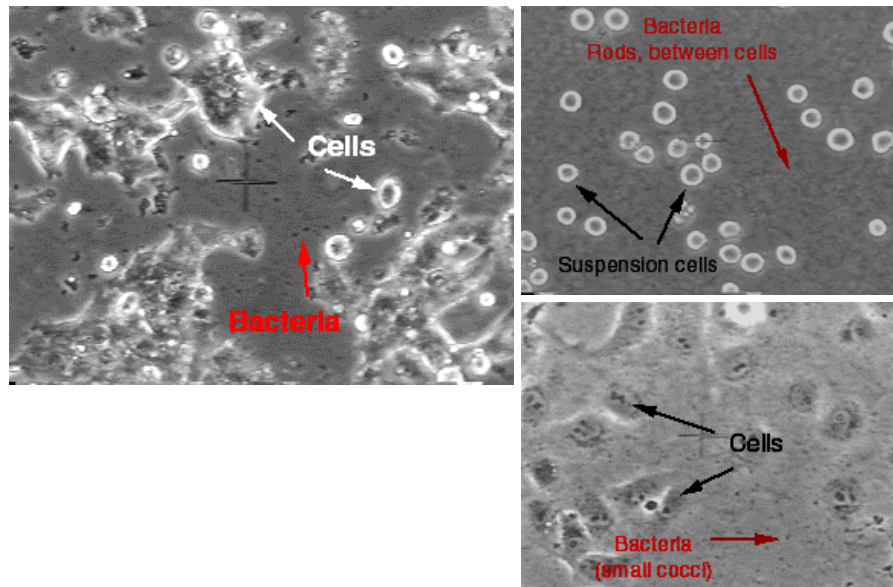
Αερόβια βακτήρια → Όξινο περιβάλλον (κίτρινο υλικό)

Αναερόβια βακτήρια → Αλκαλικό περιβάλλον (ιώδες υλικό)



(b) Floculated Contamination. Bacterial, but little drop in pH.

Βακτήρια



Μόλυνση από βακτήρια: προστασία

Αντιβιοτικά: Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Pen/strep),
καναμυκίνη,
γκενταμυκίνη,
αμπικιλίνη

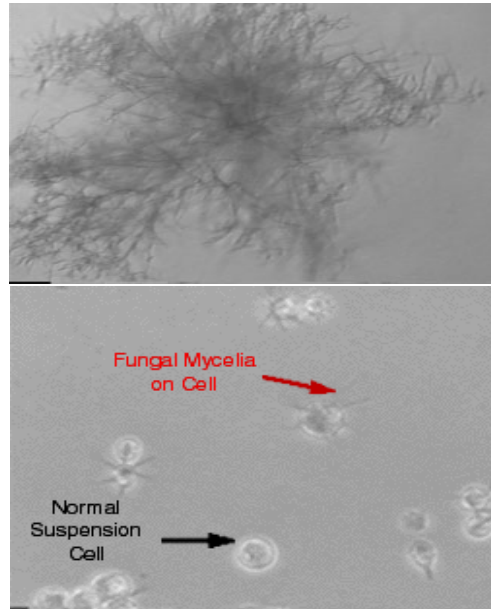
Μύκητες

Σχηματίζουν ευδιάκριτα νημάτια

Δεν μεταβάλλουν το pH.
Δεν είναι ιδιαίτερα τοξικοί.
Συνήθως δεν ακουμπούν στα κύτταρα ή στη φιάλη.

Η μόλυνση αποφεύγεται συνήθως στα πρώτα στάδια με χρήση αντιβιοτικών, όπως αμφοτερικίνη Β (Fungizone) και μυκοστατίνη (Nystatin).

Το pen/strep, η καναμυκίνη και η γκενταμυκίνη **ΔΕΝ** είναι αποτελεσματικά έναντι των μυκήτων.



Μυκόπλασμα

Μικρά προκαρυωτικά κύτταρα (0.3-0.5μM)
Μοιάζουν με τον παράγοντα που προκαλεί πνευμονία στα βοοειδή (pleuropneumonia-like organisms, PPLO).

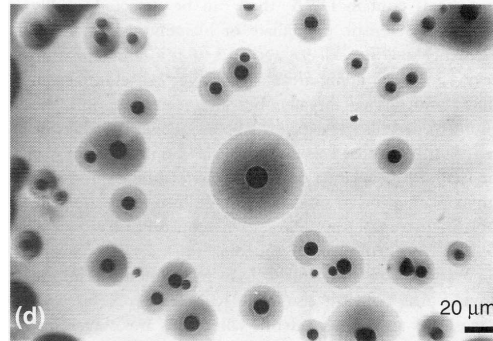
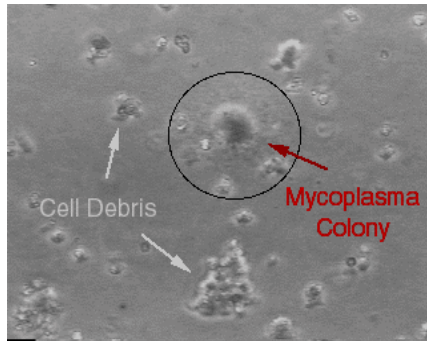
Υπάρχουν διάφορες ομάδες από δύο γένη: *Mycoplasma* και *Acholeplasma*

Αυτές που μολύνουν τα κύτταρα προέρχονται από τέσσερα είδη:

- M. orale* (ανθρώπος)
- M. hyorhinis* (χοίρος)
- M. arginini* (βόειο)
- A. laidlawii* (βόειο ή τρωκτικά)

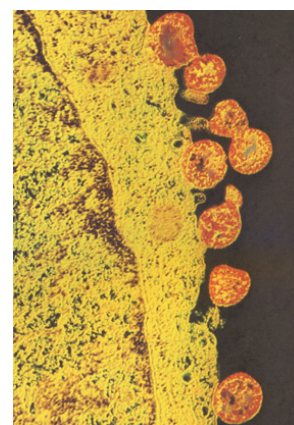
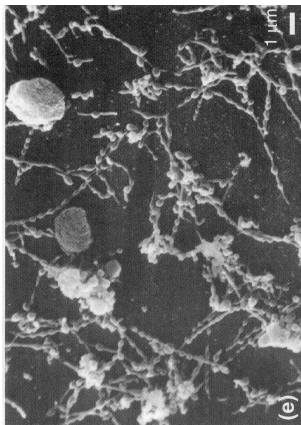
Δέν έχουν κυτταρικό τοίχωμα και μεγαλώνουν σε συγκεκριμένα υλικά (κυρίως άγαρ)

Μυκόπλασμα



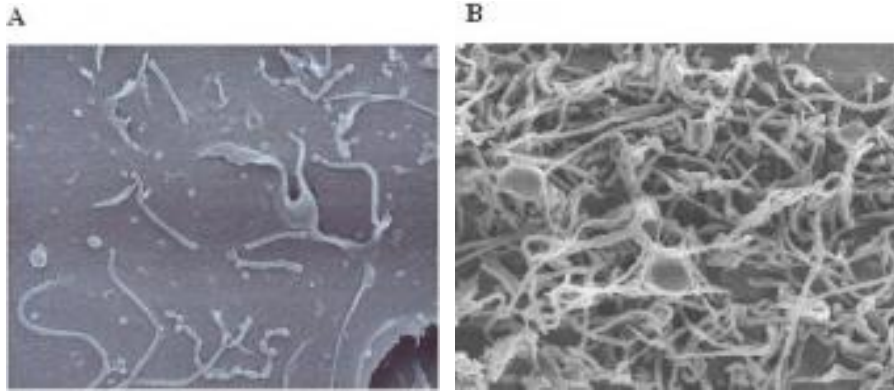
(d) Mycoplasma colonies growing on special nutrient agar, courtesy of Dr. M. Gabridge;

Μυκόπλασμα



<http://ecoserver.imbb.forth.gr/microbiology/IMAGES/Mycoplasma.jpg>

Μυκόπλασμα



HeLa cell line infected with *M. fermentans*. Scanning electron micrograph of critical point-dried cell cultures infected with infected cell line grown on coverslips. Note the impressive penetration of the mycoplasma cells into the eukaryotic cell surface (A) and the huge number of agglomerated spaghetti-like mycoplasma cells in certain areas of the eukaryotic cell surface (B). Original magnification 10,000x. (Micrographs by courtesy of Dr. M. Rohde, GBF – German Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany)

http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/main.php?content_id=95

Ανίχνευση μυκοπλάσματος

Δεν μεγαλώνουν σε αποικίες και έτσι δεν είναι ορατά στο μικροσκόπιο.

Αρχικά

- Δεν προκαλούν αλλαγές στο pH
- Δεν δρουν τοξικά.
- Επικάθονται στην κυτταρική μεμβράνη.

Στη συνέχεια αναστέλλουν το μεταβολισμό,

- Σύνθεση των πυρηνικών οξέων,
- Χρωμοσωμικές εκτροπές,
- Αλλαγές στην αντιγονικότητα των μεμβρανών.

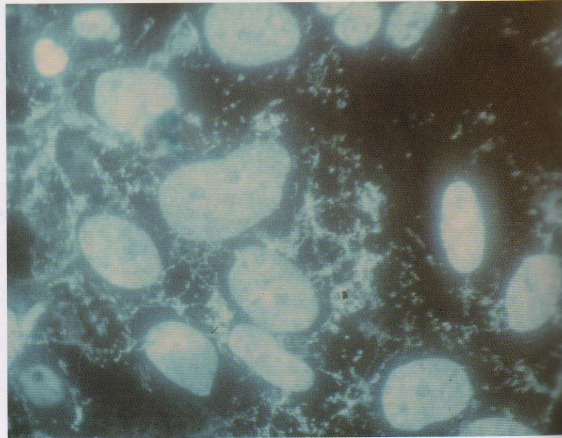
Ανίχνευση μυκοπλάσματος

Ανιχνεύεται μόνο με ειδικές τεχνικές.

- Χρώση ορκεΐνης (orcein stain)
(Fogh J. and Fogh H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968; 117: 899)
- Αυτοραδιογραφία (με [³H] θυμιδίνη, κόκκοι στην επιφάνεια των κυττάρων ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης της θυμίνης στο μυκοπλασματικό DNA)
- Χρώση φθορισμού (Hoechst 33258). Η χρωστική προσδένεται στο μυκοπλασματικό DNA στο κυτταροπλάσμα ή στη μεμβράνη.
Ανάλογα χρησιμοποιείται και η χρωστική DAPI.
- Έλεγχος κυτταρικής ανάπτυξης ("Mycotect" της Gibco).
Το μυκόπλασμα μετατρέπει τη μη τοξική ουσία 6-MPDR (6-μεθυλπουρινο δεόξυριβονουκλεοτίδιο) στις τοξικές 6-μέθυλπουρίνη και 6-μεθυλπούρινο ριβονουκλεοτίδιο) μέσω της φωσφορυλάσης αδενοσίνης.
- DNA ιχνηθέτης για μυκόπλασμα.
Βασίζεται σε τριπυμένο ιχνηθέτη της (π.χ. Gen-Probe Inc).

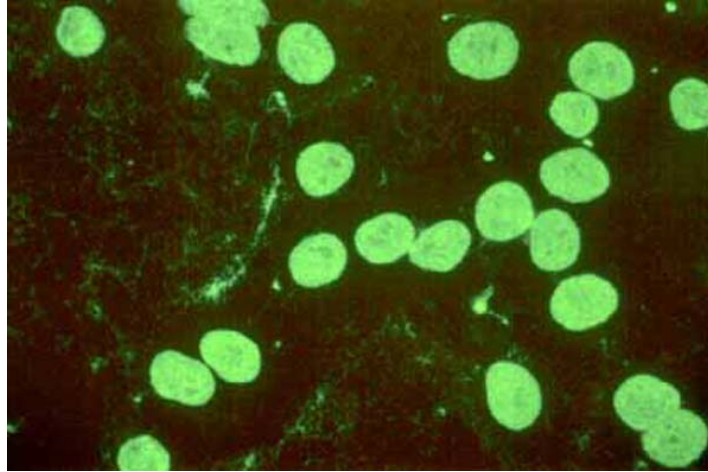


(e) *Mycoplasma*, Low Power. *Mycoplasma* infected culture as revealed by Hoechst 33258 staining. 40x objective; total magnification x180.



(f) *Mycoplasma*, High Power. Hoechst-stained mycoplasma-infected cells under 100x objective; total magnification x800.

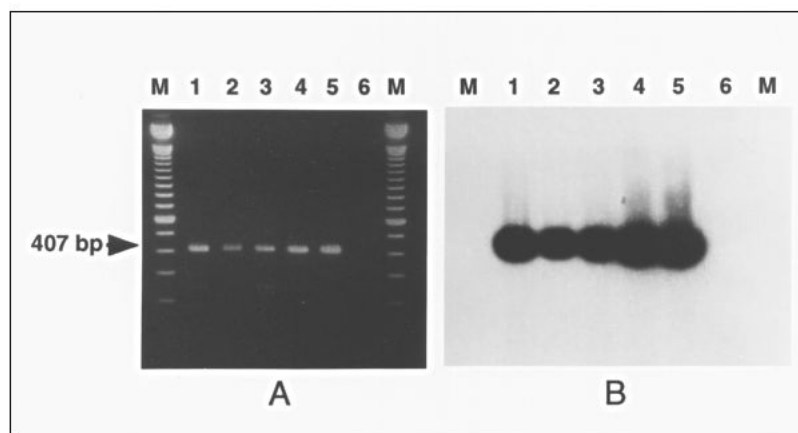
Μυκόπλασμα



Mycoplasma-infected cell cultures. Hoechst 33258 fluorochrome staining [M. Battaglia, D. Pozzi, S. Grimaldi, T. Parasassi. 1994 - Hoechst 33258 staining for detecting mycoplasma contamination in cell cultures: a method for reducing fluorescence photobleaching. *Biotechnic & Histochemistry* 69:152-156].

<http://pages2.inrete.it/mbiomed/myhoex.htm>

Μυκόπλασμα



PCR detection of *Mycoplasma penetrans* in clinical samples (2% agarose gel).

A. Lysates from the following original samples: throat swab (lane 1); tracheal aspirate (lane 2); blood (lane 3); first blood subculture (HF-1 isolate) (lane 4); *M. penetrans* GTU-54-6A1 (lane 5), showing the amplification product of 407-bp; and negative control (lane 6).

B. Southern blotting of the same material. Hybridization with the internal oligonucleotide (MYCPENET-S) probe confirmed the specific amplification of *M. penetrans* genetic sequences.

<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no1/yanezG.htm>

Αντιμετώπιση μυκοπλάσματος

Τα συνήθη αντιβιοτικά δεν είναι αποτελεσματικά.

Πιο αποτελεσματικά φαίνονται η Β-Μ κυκλίνη (Roche Mol. Biochem.) και η κιπροφλοξακίνη.

Plasmocin, Plasmocure (Invivogen)

Ζύμη

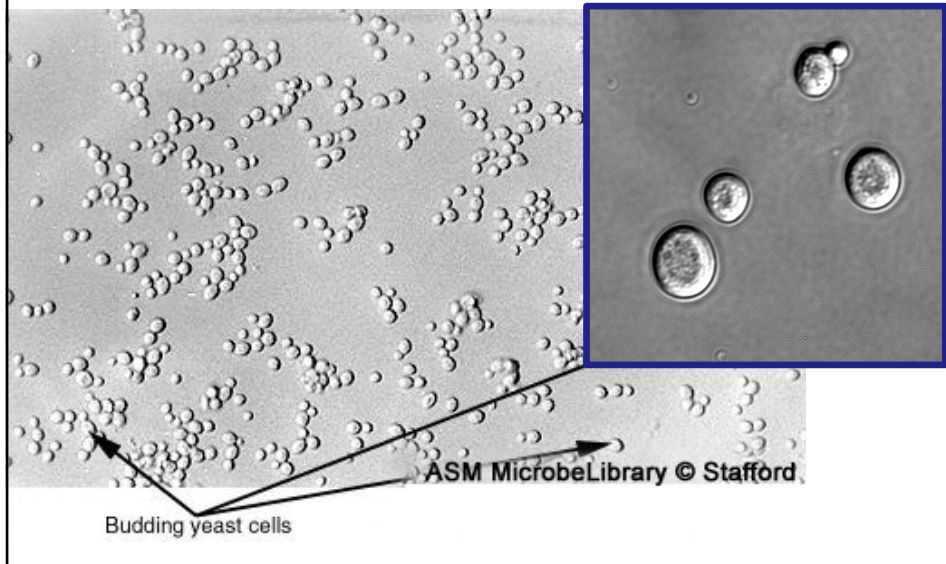
Αρχικά και η ζύμη δεν προκαλεί αλλαγές pH.

Στη συνέχεια όμως, το υλικό γίνεται θολό και το υλικό βασικό.

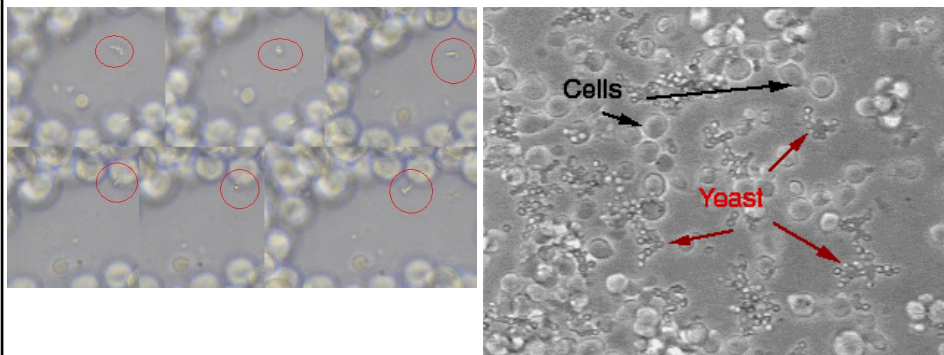


(c) Contaminated Medium Bottle. Cloudy with sediment; yeast.

Ζύμη

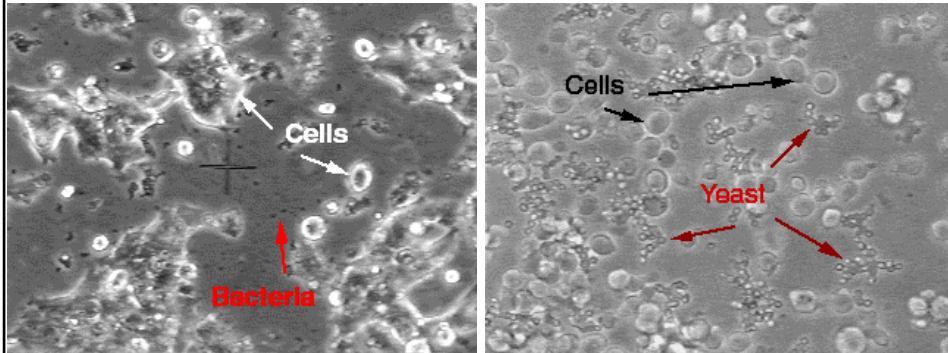


Ζύμη



Σε μεγένθυση 100x φαίνονται
χωριστά ή
αλυσίδες δύο, τεσσάρων ή περισσότερων
σωματιδίων, (λόγω της εκβλάστησης, budding yeast)

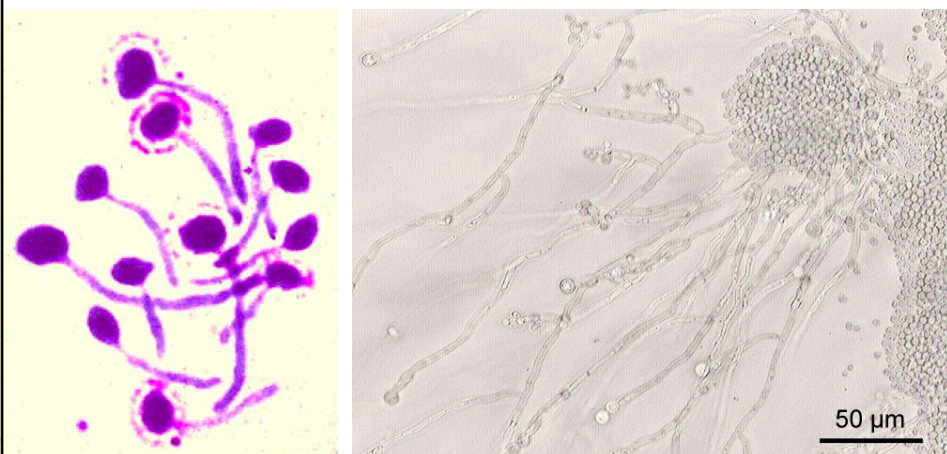
Ζύμη



Διακρίνονται από τα βακτήρια καθότι είναι:

- μεγαλύτερες από αυτά, και
- μικρότερες από τυπικά κύτταρα θηλαστικών.

Candida albicans



Αντιμετώπιση

Κυρίως με αντιβιοτικά έναντι των μυκήτων
αμφοτερικίνη Β (Fungizone) και
μυκοστατίνη (Nystatin).

Το pen/strep, η καναμυκίνη και η γκενταμυκίνη
ΔΕΝ είναι αποτελεσματικά έναντι της ζύμης.

Εργασία, Προφυλάξεις

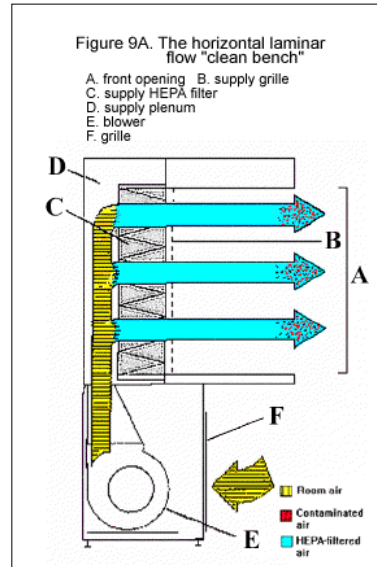
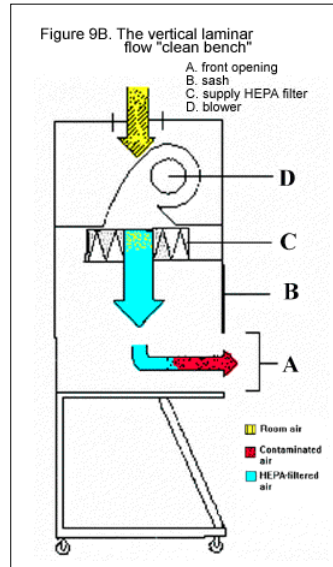
Ασηπτικές συνθήκες

- Εργασία με το κεφάλι όσο πιο μακριά από ανοιχτά δοχεία και φιάσκες.
- Χρήση (αυτόματων) πιπιετών
- Εργασία σε laminar flow ή κοντά σε λύχνο Bunsen.
- Καθαρίζουμε τα δοχεία και φιάλες εξωτερικά με αιθανόλη 70°.
- Το άκρο των πιπιετών δείχνει πάντα προς τα εμπρός χωρίς να ακουμπούμε τη βαθμονομημένη περιοχή.
- Χαλαρώνουμε τα καπάκια πρίν χρησιμοποιήσουμε τις πιπέτες.
- Δεν αφήνουμε ποτέ γύρω σταγόνες υλικού ή άλλου υγρού που μπορεί να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί.
- Η πιο «εύκολη» εστία μόλυνσης είναι το υδατόλουτρο, όπου προθερμαίνονται τα υλικά, και ο κλίβανος των 37°C.



Laminar flow

Συσκευή νηματοειδούς ροής (Laminar flow)



HEPA: high efficiency particulate air

Εργαλεία και εργασία



