

## Contaminación del cultivo celular. Origen y cómo evitarla.

Amezcuca Hernández V 1, Doello González K 1, Mesas Hernández C 2, Delgado Pérez JR 1.

1 Medical Oncology Service, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

2 Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain.

\*Corresponding author: Victor Amezcuca Hernández, Medical Oncology Service, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. email: euroncame@gmail.com

La contaminación de los cultivos es tan frecuente como importante. Al cabo del año se producen ingentes pérdidas vinculadas a la contaminación. Ésta, puede producirse por amenazas de mucha naturaleza, tal como veremos más abajo. Las consecuencias de la contaminación de los cultivos van desde la pérdida de tiempo, dinero y esfuerzo a la generación de resultados imprecisos o erróneos, pasando por la pérdida de líneas celulares y la vergüenza personal.

Es importante tener claro, que la contaminación de los cultivos es un fenómeno que no puede ser eliminado del todo, pero siguiendo una serie de directrices mínimas, concisas y claras puede ser manejada para conseguir disminuir su frecuencia y conseguir también disminuir sus consecuencias.

Los contaminantes pueden tener una naturaleza **química**. El efecto sobre las células del cultivo. Puede llegar a surgir a consecuencia de producirse cambios en concentraciones de factores de crecimiento, nutrientes o determinados intermediarios metabólicos. Normalmente, los contaminantes químicos proceden como consecuencia de añadir al medio, aditivos.

Dependientes del medio, encontramos elementos contenidos en el agua, suero, suplementos que sino está garantizada su pureza y su conservación pueden producirnos un daño notable a nuestro trabajo.

Intentos de controlar los contaminantes procedentes del suero hay varios, como por ejemplo evitando el uso de suero fetal bovino o realizando una compra muy meditada de los aditivos, soportes físicos donde se va a llevar a cabo el cultivo o intentando usar medios de cultivo libres de suero.

El agua, es origen por su capacidad disolvente, de muchas sustancias perniciosas que acaban con las células de nuestro cultivo. Se intenta paliar este fenómeno realizando destilaciones dobles o triples, así como utilizando medios estériles de purificación basados en la ósmosis, intercambio iónico y ultrafiltración. Estos métodos son capaces de remover con efectividad partículas y trazas que se disuelven en el agua como consecuencia del lavado, enjuague de los recipientes o uso de vapor como método de esterilización en el autoclave.

Otra amenaza química son las endotoxinas.

Generalmente proceden de lipopolisacáridos presentes en bacterias Gram negativas. Están en mayor proporción en agua y suero a los que se le añaden aditivos fabricados con procesos que implican la fermentación microbiana. Estas toxinas pueden alterar notablemente la homeostasis del medio, y conviene detectarlas de una manera certera y precoz. Para ello, se usa el kit comercial LAL (Límulus Amebocito Lisate Assay). Las endotoxinas por lo general son una amenaza para cultivos in vivo, pero no debemos de olvidar que también pueden afectar a cultivos in vitro. Es importante realizar un buen mantenimiento de las aguas, insistiendo casi marcialmente en que ese mantenimiento no se realice usando resinas de intercambio iónico. Lógicamente el diagnóstico precoz es vital ante la sospecha de su presencia.

Los vasos de almacenamiento y el material de procesado del laboratorio, bien si son de plástico o cristal puede contaminarse con componentes de naturaleza orgánica, metálica, óxido procedente de los aparatos de microscopía, residuos de disolventes, o pesticidas. Como se puede intuir, esto puede influir en el normal desarrollo de las células en cultivo.

Cabe mencionar que las luces fluorescentes del área de trabajo, pueden suponer así mismo otra potencial amenaza. El mecanismo de acción son las HEPES. Este elemento, en el cual no vamos a abundar puede generar peróxido entre otras especies reductoras de oxígeno y al comportarse como radicales libres, lisan las células allí presentes.

También conviene tener cuidado con las incubadoras, tan necesarias como potencialmente peligrosas. El mueble en sí puede ser un reservorio claro de impurezas, aceites, gases, desechos y productos residuales de cultivos anteriores así como de partículas intrínsecamente contaminantes y volátiles. El sentido común reina a la hora de evitar los contaminantes dependientes de las

incubadoras. La limpieza y correcto mantenimiento del aparato, así como una celosa higiene del área de alrededor puede evitar o al menos disminuir, las posibilidades de que nuestro trabajo se eche a perder.

Otras potenciales amenazas pueden ser de naturaleza **biológicas**. Esto comprende todos los microorganismos animados que pueden colonizar y destrozar un cultivo. El reto es sospecharlos, diagnosticarlos y atajarlos a tiempo antes de que las pérdidas sean notables. Hay elementos fáciles de detectar, como las bacterias y otros más complicados, pasan más tiempo desapercibidos y pueden provocar mucho más daño como los virus, protozoos o los micoplasmas. El modo de contagio habitual es que nuestro medio entre en contacto con elementos no estériles, material de laboratorio no correctamente tratado, fallos en el transporte, conservación deficiente, manipulación falta de pericia o partículas aéreas o aerotransportadas.

Mención aparte para los Micoplasmas, pues son los microorganismos que más característicamente contaminan los cultivos. Los primeros fueron detectados allá por 1956 en cultivos de HeLa cells. Se conoce que son los responsables de la infección de entre el 11 y el 15% de los cultivos en laboratorios que usan de rutina tests específicos para su detección. Se sabe igualmente que el porcentaje es mucho mayor en instituciones que no tienen su detección programada.

El Micoplasma tiene la capacidad perniciosa de alterar la función celular, así como el crecimiento, el metabolismo, la morfología y la estructura de la membrana. Puede también favorecer la propagación de virus, alterar la excreción de interferón tanto por exceso como por defecto así como producir aberraciones cromosómicas y efectos citopáticos directos que alteren el normal funcionamiento de las células.

¿Por qué los micoplasmas? Fundamentalmente estos microbios con comportamiento bacteria-like tienen una característica que los hace únicos. Tienen el mayor potencial de autoreplicación conocido. Además, no tienen pared celular, crecen sin muchas exigencias metabólicas y se multiplican en un número muy alto en cualquier tipo de medio. A esto se le suma, que por sus características microbiológicas son muy complicados de detectar y ello les proporciona una ventana temporal muy amplia en la que dividirse y dañar el cultivo.

Descuidar el mantenimiento de las áreas comunes de trabajo causa también daños en nuestros cultivos celulares. El uso de material inadecuado, no precintado en origen o mal tratado tiene un efecto perjudicial. Estos serían claramente los más dependientes de la mano del hombre, y por ende los más evitables con la formación previa y la concienciación necesaria.

También pueden ser accidentes fortuitos los que los causen. No se pueden despreciar. A veces no todo es falta de pericia, sino un mal giro del azar. Ejemplo de esto, son las contaminaciones cruzadas, cuyo origen se sitúa en otros cultivos del laboratorio y por casualidad llega a nuestro cultivo, sembrándolo y dañándolo.

#### Medidas de control para la contaminación de los cultivos celulares.

En primer lugar, es por todos bien conocido que “mejor prevenir que curar”. Es imprescindible conocer de antemano las potenciales amenazas que pueden acechar los elementos de nuestro laboratorio. Desde agentes químicos y biológicos a deficiencias formativas del personal que manipula medios de cultivo celulares. Conviene tener previsto un plan de contingencia sucinto y claro para cuando se produzca la contaminación, así como una batería de kits diagnósticos para detectar a tiempo el problema y darle una solución precoz, antes de que sea más tarde.

Una medida universal es el uso de técnicas asépticas. Crear barreras entre el medioambiente cargado de microbios y mi cultivo es una cosa imprescindible. La utilización de material estéril tanto los soportes físicos, como guantes, como cualquier elemento que entre en contacto con el cultivo es un buen método para empezar. Una buena opción sería usar material desechable, pues muchos están precintados y de antemano sabemos que está esterilizado. En el caso de que por las características del cultivo, haya pocas probabilidades de obtener otro de características similares en el caso de que este se dañe, hay que extremar las precauciones. Un ejemplo de esto sería que fuera manipulado en al menos dos medios de cultivo diferentes, por dos trabajadores distintos que hayan extremado las condiciones de asepsia, usando dos superficies diferentes y utilizando dos sistemas de incubación distintos. Además, se recomienda la utilización para el trabajo con estos medios de cabinas de seguridad avaladas y cámaras de flujo laminar. Éstas últimas tienen la ventaja, de estar diseñadas para evitar las partículas contenidas en aerosoles y en partículas aerotrasportadas.

Un sencillo método garante de la antisepsia es el sellado hermético de los medios de cultivo para evitar injerencias del exterior. Denostar el uso de pipeta bucal, puede proteger de manera sencilla la contaminación por *Micobacterium oral* y *Micobacterium salivarium*.

Trabajar en un mismo tiempo más de una línea en la cabina de flujo laminar, puede favorecer la contaminación cruzada, por lo que en este caso no es recomendable.

Todo lo anterior, ayuda a la reducción también de las oportunidades de accidentes, junto con la limpieza pormenorizada de los autoclaves, incubadoras y todo cuanto instrumental se use para la manipulación de elementos del laboratorio. Como medidas de

protección más allá, no estaría de más tener garantizado un proceso de limpieza a fondo del espacio con programas avalados de desratización, desinfectación y desparasitación de espacios de trabajo y espacios comunes. Como complemento, usar algún test de esterilidad objetivo para comprobar la benignidad del instrumental a usar, no estaría de más.

Mención aparte para las plantas ornamentales. Actualmente son un elemento decorativo más en espacios diáfanos, aportando en muchos casos un toque de color distintivo en laboratorios con mucha monotonía. Conviene no tenerlas. Son bonitas, sí. Pero también son un reservorio de microorganismos y otras entidades biológicas potencialmente contaminantes, así como de partículas aerotransportadas. El proceso de abonado, fertilizado y uso de pesticidas, indirectamente puede dañar a las células.

Hay que conocer los distintos kits comerciales para amenazas biológicas. Los hay desarrollados para la detección indistinta de bacterias, hongos y parásitos. Van desde las técnicas más sencillas de medios de cultivo microbiológicos que satisfacen las exigencias nutricionales de los microbios a complejas técnicas de biología molecular. En cuanto al caso del micoplasma, aunque puede realizarse un método diagnóstico directo – pese a que es costoso, difícil de realizar y lleva mucho tiempo– lo que más se usa, son métodos indirectos. Entre otros, cabría destacar métodos PCR-based, Fluorocromos DNA, autoradiografías, ELISA, Inmunofluorescencia y algún que otro assay bioquímico. Comparativamente, el más usado, de lejos es el fluorocromo DNA.

Para el análisis de otros potenciales contaminantes biológicos no micoplasmiales, podemos usar desde el cariotipado simple, con análisis cromosómico cualitativo y cuantitativo a técnicas de electroforesis, proteómica, análisis molecular, técnicas

inmunológicas y bioquímicas, así como técnicas de DNA-fingerprinting.

Tal como hemos mencionado antes, el análisis por cromatografía u otros medios que estudien la composición del suero y de los medios destinados al cultivo, a parte del uso de agua purificada como disolvente puede disminuir de manera notable las amenazas de naturaleza química.

### ¿Qué soluciones podemos adoptar cuando se nos ha contaminado un cultivo?

Una de ellas, la primera, sería tener una pequeña cuota de las mismas células que conforman nuestro cultivo. Este medio de reposición celular, yacería criopreservado a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Se extraería tras dos semanas de crecimiento en un medio pobre en antibiótico, se realizaría un test específico para objetivar que están libres de contaminación y se guardarían. Lógicamente antes de ponerlas de nuevo en funcionamiento, se las haría pasar por otro test, que avalara que no están contaminadas con algún agente que ulteriormente estropee el cultivo.

La segunda, podríamos citar el uso estratégico de antibióticos. En este particular, conviene hacer un uso inteligente de los mismos, ya que no hacerlo así puede resultar peligroso para nuestro cultivo. Es necesario usar un medio libre de antibióticos al ser posible. En un análisis retrospectivo, se vio que en torno al 72% de los medios no libres de antibiótico estaban contaminados por micoplasma, además de observar que había un claro incremento de las resistencias a fármacos tradicionalmente válidos para éste, como los aminoglucosidos, los macrólidos o la kanamicina. También en un 20% se observó resistencia para los fármacos diseñados para combatir el micoplasma, como el ciprofloxacino.

El uso inteligente de antibióticos, jamás puede sustituir a una buena técnica aséptica, sino complementarla. Sólo deben de usarse

para salvar a un cultivo de la destrucción en caso de infección. De usar uno, tiene que ser efectivo, no citotóxico y estable. Si la infección es por hongos, los kits comerciales antifúngicos tienen la particularidad de que solo previenen la infección, pero que de producirse, no actuarían como fungicidas.

La contaminación puede curarse con el uso también del autoclave. Hay que tener en cuenta que puede dañarse irreversiblemente el cultivo, al producirse por temperatura cambios en la conformación proteica intracelular. Unas se dañan irreversiblemente y otras cambiarían su conformación dándole un comportamiento bioquímicamente inestable. El concurso de sueros con propiedades antibióticas u otros tratamientos químicos diseñados 'ad hoc' para la contaminación, pueden ser así mismo de ayuda.

Como conclusión a esta pequeña revisión, debe de quedar claro que la contaminación debe de evitarse en primer lugar con una buena técnica aséptica además de un uso estratégico e inteligente de antibióticos y reposiciones celulares criogenizadas. Extremar las condiciones higiénicas del área de trabajo, instrumental y medios de conservación acompañados de un conocimiento minucioso de las potenciales amenazas de nuestro laboratorio hace que podamos detectar a tiempo y corregir una contaminación de un cultivo celular.

No debemos de olvidar la conveniencia de tener en todo momento y en todo lugar una monitorización exhaustiva de nuestros objetos de estudio para saber si están o no contaminados.

## **Referencias**

1. Ryan, John A. Understanding and managing cell culture contamination. Technical Bulletin. Corning Incorporated, 1994.