
	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 1 de 16

## Contenido

1. OBJETIVO:.....	2
2. ÁMBITO DE APLICACIÓN:.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	2
4. PERSONAL AUTORIZADO .....	3
4.1. Datos de los responsables .....	3
5. DESCRIPCIÓN DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES:.....	3
5.1. Laboratorios de Primarios.....	3
5.2. Laboratorios de Líneas.....	3
6. NORMAS BÁSICAS DEL LABORATORIO.....	4
7. INSTRUCCIONES DE USO DE LOS APARATOS: .....	5
7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:.....	5
7.2. INCUBADORES DE CO <sub>2</sub> .....	9
7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS .....	10
7.4. CENTRÍFUGAS: .....	11
7.5. BAÑOS: .....	12
7.6. TANQUE DE N <sub>2</sub> LÍQUIDO (-196°C): .....	12
7.7. CAMERA DE HIPOXIA .....	12
8. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS .....	13
9. INSTRUCCIONES EN CASO DE CONTAMINACIÓN:.....	14
10. CONTROL DE Micoplasma EN LÍNEAS:.....	14
11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍAS E INCIDENCIAS: .....	15
12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:.....	15
ANEXO I. Tareas de mantenimiento de los aparatos y de los laboratorios .....	16

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 2 de 16

## 1. OBJETIVO:

Dar a conocer la estructura y características de los laboratorios del SCT-CC, las normas básicas de trabajo y de uso de los aparatos, así como las personas responsables a quien dirigirse en caso de averías, contaminaciones, accidentes o sugerencias.

## 2. ÁMBITO DE APLICACIÓN:

Usuarios de los laboratorios de Cultivos Celulares de la UdL-IRBLleida.

## 3. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular de mamíferos es el proceso o conjunto de técnicas que permiten el crecimiento de fragmentos tisulares de diferentes especies en un ambiente artificial “in vitro” para examinar y manipular el comportamiento celular, manteniendo al máximo sus propiedades (fisiológicas, metabólicas, bioquímicas, genéticas...). En los laboratorios de cultivos celulares se trabaja con el cultivo de células que pueden venir de líneas celulares inmortalizadas o con cultivos primarios (obtenidos de tejidos provenientes de murinos criados en el estabulario con esta finalidad, tejidos humanos,...).


La característica principal, que define el laboratorio de cultivos celulares, es el **mantenimiento de la asepsia** porque la tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior a la de los contaminantes habituales (hongos, levaduras y bacterias). Por tanto, para el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición de cualquier microorganismo no deseado.

El **Servicio de Cultivos celulares** (SCT-CC) es un servicio de tipo II, adscrito al Departamento de Ciencias Médicas Básicas (CMB) de la UdL y da servicio a todos los usuarios de los diferentes departamentos de la Universidad y también a los usuarios externos.

El SCT-CC se encuentra ubicado en el **edificio de Biomedicina** y cuenta con **7 laboratorios** de cultivos celulares y una **zona de crioconservación** celular con tanques de Nitrógeno líquido.

1. **Lab -1.3:** Laboratorio de Líneas
2. **Lab 1.9:** Laboratorio de Líneas
3. **Lab 2.9:** Laboratorio de Primarios
4. **Lab 2.16:** Laboratorio de cultivos delicados (stem cells) o de larga duración libres de micoplasma y virus.
5. **Lab 3.9:** Laboratorio de Primarios
6. **Lab 3.16:** Laboratorio de cultivos para cultivar derivados de muestras humanas y/o producción de lentivirus.
7. **Lab 4.11:** Laboratorio de disección.

Los coordinadores y asesores científicos del SCT son Serafí Cambray y Judit Ribas. Y los técnicos del servicio son Marta Rafel (IRB) como técnico superior responsable, y Iván Hidalgo (UdL) como a técnico cualificado de soporte.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 3 de 16

## 4. PERSONAL AUTORIZADO

Al laboratorio de cultivos celulares **sólo entrará el personal autorizado.**

El primer día de entrar al servicio, los nuevos usuarios rellenarán una ficha con sus datos personales y los técnicos les harán una explicación de las directrices del servicio. Así mismo los nuevos usuarios tendrán que acreditar haber entendido y aceptado el reglamento a través de un pequeño test. El servicio se reserva el derecho de admisión a las instalaciones en caso de no cumplir con la normativa establecida en ellas.


### 4.1. Datos de los responsables:

	<b>Nombre</b>	<b>Localización</b>	<b>e-mail</b>	<b>Ext. telf.</b>
Coordinador y asesor científico	Serafi Cambray Judith Ribas	Despacho 1.11 BioI Lab. b2.2	scambray@irbllleida.cat judith.ribas@mex.udl.cat	2482 2936
Responsable Técnico	Marta Rafel	Despacho 2.4 Bio. II	mrafel@irbllleida.cat	2953 12953
Técnico cualificado de soporte a tiempo parcial	Iván Hidalgo	Despacho 2.4 Bio. II	ivan.hidalgo@udl.cat	2953 12953

## 5. DESCRIPCIÓN DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES:


**5.1. Laboratorios de Primarios:** Destinados al trabajo con cultivos primarios, células humanas y células contaminadas con micoplasma o no testadas.

**5.2. Laboratorios de Líneas:** Destinados al trabajo con líneas celulares estables libres de micoplasma.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 4 de 16

## 6. NORMAS BÁSICAS DEL LABORATORIO

1. En el laboratorio está **prohibido** comer, beber, fumar, masticar chicle, maquillarse, manipular lentes de contacto y almacenar alimentos o bebidas.
2. El laboratorio se mantendrá **ordenado, limpio** y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
3. Para entrar a las salas de cultivos se ha de llevar **bata limpia de manga larga**, preferiblemente batas exclusivas para el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares.
4. Las superficies de trabajo se **desinfectarán al principio y al final** de cada uso con etanol o “fagetriald” (teniendo en cuenta las medidas de seguridad) y después de todo vertido de material potencialmente peligroso (medio, células, virus...).
5. Cuando se trabaja en la campana de flujo laminar **rociarse con etanol** manos y mangas.
6. Evitad la introducción de **libretas, calculadoras, cajas de cartón** o papel dentro de la campana, pueden ser fuente de contaminación.
7. Se han de utilizar **guantes en todos los casos de manipulación de células**. En el caso de la BioIIA se utilizará doble guante.
8. Una vez utilizados se sacarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos. No se ha de salir del laboratorio con los guantes puestos.
9. Se tiene que **evitar el contacto de los guantes de trabajo con los aparatos** del laboratorio y el pomo de la puerta.
10. En acabar de trabajar, se ha de recoger todo el material utilizado y dejar las **campanas vacías**, limpias y desinfectadas después de su uso.
11. Mientras no se trabaje, el **interior de las campanas ha de estar vacío**. En el caso de la Bio-II-A únicamente se mantiene dentro el pote de aspiración, un pote para pipetas largas y un contenedor amarillo (para evitar los riesgos que comportan los residuos de esta campana).
12. Todos los materiales, **muestras y cultivos** contaminados tendrán que ser **descontaminados** antes de eliminarlos. En el caso de cultivos que se han de eliminar, se neutralizaran primero con lejía, se aspirará el medio neutralizado y se eliminará la placa con los residuos sólidos.
13. **Los residuos sólidos contaminados se vierten en los contenedores negros** (uno para cada campana).
14. Los residuos que contengan fármacos o sustancias **citotóxicas** se vierten al contenedor **azul** (uno por sala).
15. **EL PAPEL, PLÁSTICO, POREXPAN**, etc. limpios y **NO CONTAMINADOS VAN EN LOS CONTENEDORES DE RECICLAGE** (situados en los pasillos).
16. Si el contenedor negro, azul, o amarillo está lleno, cualquier usuario puede cerrarlo adecuadamente y coger uno vacío (dentro de la sala). En el caso de residuos líquidos, primero se neutralizará con lejía y seguidamente se vaciará en la garrafa de residuos citotóxicos líquidos (al lado de la pica).

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 5 de 16

17. En el caso de la Bio-II-A, las puntas de las pipetas, pasteurs, agujas, jeringuillas, etc. se desechan en el contenedor amarillo y las pipetas largas en el recipiente con agua y jabón para pipetas, que se encuentran dentro de la campana. Todos los líquidos se aspiraran en la botella de aspiración ubicada dentro de la campana.
18. Una vez finalizado el trabajo, el **tubo de aspiración** se tiene que **limpiar** con lejía y etanol hasta neutralizar los líquidos contaminantes o medios de cultivo aspirados (cambio de color del rojo-fenol del medio a transparente) y **cerrar el vacío** para evitar el uso constante de la bomba.
19. No verter ningún líquido sucio en el baño. Si accidentalmente ocurriera avisar a los técnicos del servicio.  
El **baño** se tiene que **apagar** una vez finalizado su uso. Es importante evitar que quede encendido, se queme la resistencia y pueda producir un incendio.
20. **Nunca se ha de llevar material de Primarios a Líneas, ya que podría ser fuente de contaminación para las líneas celulares.**

## 7. INSTRUCCIONES DE USO DE LOS APARATOS:

Las instrucciones básicas a seguir para cada aparato son las siguientes:

### 7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:

#### a. Definición:

Su función es la de mantener un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras...) que puedan acceder al cultivo.

Según el tipo de cabina protegerá:


- el personal de agentes nocivos.
- el producto de los diferentes contaminantes.
- el medio ambiente (externo a la cabina) de productos contaminantes.

#### b. Tipos de cabinas:

Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no del manipulador. Se ha de tener en cuenta que la distribución del material en la campana de flujo horizontal ha de ser diferente que en la campana de flujo vertical, ya que el material de primera línea no queda tan protegido como el que se encuentra al fondo.

Las cabinas de flujo laminar vertical aseguran una buena protección del producto, y, según su diseño, también una protección parcial del manipulador.

La Cabina de bioseguridad clase II protege el producto, el manipulador y el medio ambiente. En las de tipo A el 30% del aire es eliminado en cada ciclo y el 70% recircula. Es la más adecuada para el trabajo con agentes patógenos particulados de riesgo 2 (Agentes biológicos que pueden ser causa de enfermedades humanas y que podrían constituir un peligro para los trabajadores. Pocas veces producen

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 6 de 16

infecciones. Es poco probable que se propaguen al colectivo y se suele disponer de medidas de profilaxis o tratamientos efectivos).

\*Las campanas de flujo laminar no se consideran campanas de bioseguridad. Las campanas de bioseguridad de tipo I son aquellas que protegen al manipulador pero no a la esterilidad del producto (campanas químicas o de humos)

		CLASE I	CLASE II TIPO A	CLASE II TIPO B	CLASE III
<b>AGENTES BIOLÓGICOS</b>	GRUPO RIESGO 1	(1)	(1)	(1)	(1)
	GRUPO RIESGO 2	(1)	(1)	(1)	(1)
	GRUPO RIESGO 3	(3)	(2)	(2)	(1)
	GRUPO RIESGO 4	(3)	(3)	(3)	(1)
<b>PRODUCTOS DE ALTA TOXICIDAD</b>					
CANCERIGENOS		(2) (*)	(1) (*)	(1) (*)	(1) (*)
SENSIBILIZANTES					
OTROS					

(1) Totalmente indicada    (2) Puede utilizarse    (3) Uso no recomendado

**Cuadro 1. Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo**

**Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo)**

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

**Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)**

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

**Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)**

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.


**Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado)**

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

**7.1.1. Normas generales:**

Antes de empezar a trabajar:


1. Reservad la campana el tiempo necesario para realizar el experimento en el **registro** (P-CC-04) colgado en cada una de las campanas (es obligatorio reservar el mismo día).

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 7 de 16

2. Limpiad y desinfectad la campana con el desinfectante adecuado:
  - Etanol al 70% (efecto inmediato, se ha de secar a continuación. **No utilizar en la mampara de metacrilato**, ya que este no es resistente y al reaccionar provoca opacidad).
  - Fagetriald 0.5% (dejar actuar **10 minutos** antes de secar. **ATENCIÓN:** Contiene aldehídos (como el formaldehido), aplicarlo en ausencia de gente en la sala, produce vapores tóxicos. Es bueno *versus* los virus y las esporas.
3. Colocad todo el material fungible que vayáis a utilizar dentro sin apilarlo, permitiendo que los UV lleguen a todas partes (previamente lo habremos rociado con etanol, sobretudo en la zona de las juntas). **ATENCIÓN:** los UV de la campana son UVC, de alta energía, germicidas. Evitad cualquier contacto con los ojos y la piel.
4. Encended los UV y el flujo unos 5-10 minutos antes de empezar a trabajar.
5. Cerrad los UV y encended la luz para empezar a trabajar.

En trabajar en la campana:

1. Trabajar con bata y guantes (rociad los guantes y las mangas con etanol antes de empezar).
2. Poner todo el material lo más adentro posible de la campana: al trabajar se han de dejar libres las rejillas de ventilación.
3. No pasar nunca los brazos por encima de la muestra.
4. Evitad dejar los tapones de las botellas y tubos en la superficie de la campana (ponerlos y quitarlos cada vez sujetándolos con la mano). Si es necesario dejar el tapón en la superficie, dejarlo hacia arriba y lejos del área de trabajo, para no pasar el brazo por encima.
5. Vigilar de no tocar con los guantes el material estéril que entrará en contacto con las células. En caso de duda, descartar el material o identificad la placa para hacerle un seguimiento.
6. Abrid el material de un solo uso dentro de la campana. Si el material estéril entra en contacto accidentalmente con el material no estéril, no devolverlo dentro del medio de cultivo o tampón. Es preferible desechar la pipeta cada vez que se ha finalizado su uso y coger una de nueva si se vuelve a necesitar, que dejarla abierta dentro de la botella.
7. Para aspirar líquidos, encended la bomba de aspiración y conectar una pipeta Pasteur al tubo (si se han de aspirar diferentes líquidos es bueno añadir una punta de pipeta amarilla e irla cambiando para no tener que cambiar cada vez la pipeta Pasteur).
8. Tirad el material que ha estado en contacto con la muestra biológica al contenedor negro/azul de residuos.
9. Descartad el resto de material limpio (PLÁSTICOS; PAPEL; CARTÓN; POREXPAN) a las papeleras reciclaje.
10. Antes de eliminar las células dejarlas 15 minutos en lejía diluido al 70%, después aspirar la parte líquida y descartar la placa en el contenedor negro. No tirar líquidos citotóxicos por el fregadero.
11. No trasladar placas con cultivo de un laboratorio a otro, excepto por causas mayores.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 8 de 16

Al terminar de trabajar:

- Recoged y desinfectad con etanol diluido al 70% todo el material utilizado, asegurados que la superficie de la campana queda limpia de residuos sólidos y líquidos y dejad la campana vacía.
- Tirad la pipeta Pasteur de aspiración en el contenedor de residuos negro/azul y desinfectad el tubo de aspiración primero con lejía al 70% y después con etanol 70% hasta **que no queden restos de medio de cultivo en el tubo y el depósito de residuos líquidos vire de color a neutro (decolorado)**.
- Limpiad la **superficie y desinfectarla** con etanol o fagetrinald (teniendo en cuenta las medidas de seguridad)
- Dejad los UV funcionando 5-10 minutos (la mayoría de campanas se pueden programar durante 20 minutos, pulsando el botón con la flecha hacia arriba una vez se hayan encendido los UV).

<b>7.1.2. <u>Bio-II-A:</u></b>
--------------------------------


Actividades generales que se realizan en la campana:

- a. Producción de virus.
- b. Infección de líneas celulares o cultivos primarios.
- c. Cultivos primarios de células humanas (potenciales transmisores de enfermedades víricas).

Normas de trabajo:

1. Al encender los UV no se ha de extraer la tapa frontal.
2. Trabajad con bata de manga larga ajustada a las muñecas y con doble guante.
3. No aplicar etanol a los guantes interiores antes de poner el segundo par (el etanol los permeabiliza).
4. Tirad el material pequeño contaminado (puntas, eppendorfs, pipetas Pasteur, guantes externos...) en el contenedor de residuos amarillo situado dentro de la campana.
5. Tirad las pipetas largas en el vaso de precipitados con agua y jabón que hay dentro de la campana.
6. Dejad el resto de material contaminado dentro de la campana rociado con etanol al 70% y con los UV unos 10 minutos para descontaminarlo y después tirarlo al contenedor de residuos negro/azul.
7. Los líquidos se tienen que aspirar en un recipiente que contiene **lejía al 70%**. Solo vaciaremos el recipiente cuando el medio esté neutralizado. Sabremos que las muestras biológicas se ha inactivado utilizando lejía y el color rojo-fenol del medio de cultivo, el cual es un indicador fiable para determinar si la solución ha quedado neutralizada cuando vira de rojo a incoloro, por lo tanto:
  - Medio amarillo-blanco: lejía completamente activa, podemos descartar el líquido.
  - Medio naranja-rosado: hace falta añadir más lejía. Hay que esperar como mínimo 10 minutos para manipular el recipiente de aspiración fuera de la campana.



	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 9 de 16


8. Por lo tanto, en terminar de trabajar se ha de desinfectar con **lejía al 70%** el tubo de aspiración hasta que el líquido del recipiente esté neutralizado y después echarle **etanol al 70%** para que no queden restos de lejía en el tubo.
9. **Para eliminar células:** poned lejía al 70%, dejad actual la lejía durante 15 minutos, aspirar el líquido, destapar la placa y dejar los UV 15 minutos. Finalmente eliminad el material y el residuo sólido en el contenedor negro.
10. Las muestras biológicas se pueden sacar de la campana una vez se ha lisado o fijado el cultivo. La superficie externa de los tubos, medios, placas... que contengan las muestras se han de descontaminar pasando un papel con lejía, secar y posteriormente tratar con etanol al 70% antes de ponerlos en las centrifugas o cualquier otro aparato, o bien, sacar-lo de la sala.
11. Trabajad de forma cuidadosa para evitar derrames y producción de aerosoles. No mantener las pipetas largas enganchadas al pipeteador encima de la superficie de trabajo para evitar goteo. Tened una precaución especial a la hora de *vortear* y centrifugar tubos y eppendorfs, sobre todo si llevan sustancias infecciosas. Comprobad que los tubos y epp están perfectamente bien cerrados.
12. En caso de derrame de medio contaminado:
  - Cubrid el medio con papel absorbente e inmediatamente neutralizarlo con lejía concentrada durante 10-15 minutos.
  - Tirar el papel en el contenedor de residuos contaminados.
  - Desinfectad la superficie con etanol al 70%.
13. En caso de que se produzca un derrame en el rotor de la centrifuga, esperad un poco antes de abrirla para evitar respirar los aerosoles producidos y proceder como en la BIO-II-A. Finalmente, dejad el material roto dentro de la campana con los UV durante 20 minutos.
14. En caso de accidente del manipulador:
  - Primeramente, sacad la ropa que se haya podido contaminar. Ésta se descontaminará dentro de la campana con los UV y posteriormente, se lavará con lejía.
  - Limpiad bien la piel o la herida con agua corriente sin fregar para no irritar la piel.
  - Desinfectar con etanol al 70%.
  - Si se trata de una herida abierta aplicar providona yodada (betadine) y apósito.

## **7.2. INCUBADORES DE CO2:**

### **a. Definición:**

El incubador de CO2 es una cámara que mantiene los cultivos en unas condiciones atmosféricas constantes y óptimas para su crecimiento:

- Temperatura de 37°C (temperatura fisiológica de las células).
- Concentración de CO2 (5%) (necesario para la respiración celular).
- Humedad elevada (para evitar la evaporación del agua del medio de cultivo).

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 10 de 16

Para mantener estas constantes en el interior del incubador hay una bandeja con agua destilada y se produce una recirculación de aire forzado favorecida por los agujeros de las estanterías.

#### **b. Instrucciones de uso:**

1. Las placas se depositarán en el incubador correspondiente (primarios, líneas, virus) encima de bandejas, para facilitar el depósito de placas en las estanterías y para evitar derrames en el incubador. Las bandejas son propiedad de cada grupo.
2. Se ha de tener la precaución de no abrir demasiado rato la puerta del incubador para no desestabilizar las constantes atmosféricas del interior.
3. La manipulación de las placas se ha de hacer con cuidado para evitar derrames cogiéndolas de forma que no se abra la tapa y no pierda la horizontalidad.
4. Para evitar contaminaciones es necesario mantener las estanterías limpias, y, si hay un derrame accidental ponerle papel con lejía, secarlo y desinfectarlo con etanol. Si se trata del incubador de virus dejar actuar la lejía 15 minutos. Finalmente anotar en la hoja de incidencias.
5. Cuando tengamos cultivos contaminados tendremos que eliminarlos inmediatamente y anotar en el **registro de contaminaciones** del laboratorio.
6. Los incubadores se calibran cada cierto tiempo automáticamente. Mientras el incubador se está calibrando no se puede abrir la puerta ya que lo desestabilizaríamos. Esperaremos a que el incubador vuelva a su estado inicial.

### **7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS**


1. Limpiar los oculares con papel y etanol al 70% y la platina donde depositamos la placa a observar, así evitaremos problemas de contagio de contaminaciones entre usuarios y de las células.
2. Colocad la muestra en la platina, poner los aumentos necesarios y enfocar para visualizar las células.
3. Si hay cualquier función que no se conozca no se tiene que manipular, hay que pedir asesoramiento previamente. Si se detecta algún mal funcionamiento, avisad al personal del servicio.
4. Recordad de cerrar la luz de microscopios y lupas al terminar de trabajar.
5. En el laboratorio 1.9 tapad los microscopios y lupas si creéis que sois el último usuario que va a trabajar. Por la noche se encienden los UV en la sala y hay que protegerlos.

#### **7.3.1 Microscopios de contraste de fases invertidos:**

##### **a. Definición:**

Permiten hacer el control morfológico de las células vivas dentro del recipiente de cultivo.

El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes gruesos hace que un microscopio convencional no sea adecuado, por lo que se han desarrollado microscopios en los que la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 11 de 16

La segunda característica que condiciona el instrumento óptico es la ausencia de color de la muestra porque se trata de células vivas que tienen poco contraste y no se pueden teñir sin dañarlas. Para paliarlo, el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases, así el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

### 7.3.2 Microscopios invertidos o lupas de fluorescencia:

#### a. Definición:

Son microscopios o lupas como los anteriores pero que cuentan con una lámpara que emite luz a diferentes longitudes de onda permitiendo visualizar imágenes que tienen fluorescencia o que están marcados con fluorocromos.

Tienen una cámara acoplada y conectada a un ordenador para la captación de imágenes para documentar el estado de los cultivos.

#### b. Instrucciones de uso:

- En los microscopios de los laboratorios -1.3 y 3.9, para alargar la vida de la bombilla de fluorescencia, una vez encendida no se puede cerrar hasta pasados 15 minutos; y una vez desconectada no se puede volver a encender hasta después de 10 minutos.
- Para la gestión del mantenimiento de la lámpara de fluorescencia del microscopio hay unos **registros de tiempo de utilización** (P-CC-07) que han de ser rellenados por los usuarios.
- Seguir las instrucciones del equipo.

### 7.3.3 Lupas de disección

#### a. Definición:

Esteriomicroscopios que aumentan hasta 10 veces la muestra para facilitar la disección de tejidos. Se utilizan en los laboratorios de cultivos primarios.


#### b. Instrucciones de uso:

- Limpiar los oculares con papel y etanol al 70% y la platina donde depositamos la placa a observar, así evitaremos problemas de contagio de contaminaciones entre usuarios y de las células.
- Poner la muestra sobre la platina y enfocar para hacer la disección.
- Durante la disección se ha de vigilar con el material punzante, y si se produce un corte limpiar la herida con agua y jabón y aplicar betadine y un apósito.

## 7.4 CENTRÍFUGAS:

#### a. Definición:

En el laboratorio de cultivos se necesita una centrífuga para la precipitación de las células en suspensión, obtención de tipos celulares por gradientes, concentración de buffers o virus, etc.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 12 de 16

#### **b. Instrucciones de uso:**

- Poned el tubo o la placa dentro del adaptador del rotor y contrapesad con el mismo volumen en la posición simétrica del lado opuesto.
- Elegid el programa adecuado y poner en marcha el aparato.
- Si se produce la rotura de un tubo dentro de la centrifuga: antes de abrirla esperad que se depositen los aerosoles que se hayan podido formar, desinfectad con un papel con lejía y seguidamente con etanol. Si se trata de virus, dejad actuar la lejía unos 15 minutos.

### **7.5 BAÑOS:**

#### **a. Definición:**

Cubetas con cabezal termostático para calentar los medios de cultivo, suero y otras sustancias en un baño húmedo. El cabezal está programado para que el agua llegue a una temperatura de 37°C y se mantenga. Mediante un sistema de impulsión del agua se consigue homogenizar la temperatura en todo el baño.

#### **b. Instrucciones de uso:**

- Rellenar el baño con agua destilada hasta que cubra la resistencia (algunos baños se bloquean si no hay suficiente agua y antes de volver a ponerlos en marcha hay que hacerles un reset).
- Conectad el cabezal (tardará aproximadamente 15 minutos en llegar a la temperatura de 37°C).
- Cuando no haya botellas ni tubos dentro del baño, apagad el cabezal.

### **7.6. TANQUE DE N<sub>2</sub> LÍQUIDO (-196°C):**

#### **a. Definición:**


Tanque que contiene N<sub>2</sub> líquido que tiene un alto poder frigorífico (-196°C) y se utiliza para almacenar las líneas celulares.

#### **b. Instrucciones de uso:**

- Se tiene que manipular con guantes y es conveniente proteger los ojos y llevar zapatos tapados para proteger los pies de posibles salpicaduras ya que el contacto directo con la piel produce quemaduras.
- Cada grupo tiene asignadas unas cajas y controla sus viales.
- Antes de abrir la tapa, hay que saber en qué rack se encuentra el vial que os interesa para evitar una evaporación excesiva, de N<sub>2</sub>, ya que además desplaza el oxígeno.

### **7.7 CAMERA DE HIPOXIA**

La cámara de hipoxia es una cabina de cultivo celular cerrada herméticamente que permite el control y la regulación de la concentración de oxígeno, CO<sub>2</sub>, temperatura y humedad. Tienen la característica que las muestras se pueden introducir, manipular, incubar, examinar y quitar sin perder las condiciones ambientales pre establecidas. Antes de usarla por primera vez, contactad con los técnicos del servicio.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 13 de 16

## 8. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS

Una de las principales fuentes de contaminación en el laboratorio de cultivos celulares es el propio individuo.

En los laboratorios de cultivos celulares es imposible trabajar completamente sin gérmenes, pero se puede reducir la densidad teniendo en cuenta la fuente de estas contaminaciones.

A menudo los cultivos se contaminan con microorganismos procedentes de las manos o la boca, es por eso que es de vital importancia la utilización de guantes y lavarse las manos cada vez que se trabaja, así como el uso de sustancias desinfectantes tales como el etanol.

Otra fuente de contaminación es la ropa. Ponerse una bata limpia antes de entrar en una sala de cultivos o unos zapatos diferentes a los de uso diario ayudan a reducir en gran medida el número de gérmenes presentes en la sala. Así como evitar ropa de lana o similares para trabajar en las campanas ya que son fuente de contaminación.

→ Es por eso que, hay que llevar bata limpia, trabajar con guantes estériles y evitar todo contacto con el material que tenga que entrar en contacto con el cultivo. Evitar pasar la mano o el brazo por encima de cualquier material abierto, ya sean placas, puntas, tubos, medios etc. contengan o no el cultivo y trabajad en la parte central de la campana.

Por la misma razón, una vez se está trabajando en la campana no se debería responder al teléfono, tocar pomos de las puertas con los guantes, ni rascarse el pelo, nariz etc. sin antes cambiarse de guantes, lavarse las manos o desinfectarlos.

La superficie de la campana tiene que estar libre de aglomeración de material. Por eso debemos evitar entrar cajas de cartón etc. y procurar que el flujo de aire y la luz ultravioleta pueda pasar entre todos los objetos presentes en la campana.


Otra fuente de contaminación pueden ser los aerosoles que se pueden producir.

→ Por eso debe evitarse:

- Utilizar el mismo medio, PBS, tripsina, etc. para diferentes tipos celulares.
- Trabajar en paralelo con más de una línea celular en la campana.
- Trabajar con material no estéril o contaminado.
- Cuando se retiren los medios y otros productos del baño para usarlos en la campana es muy importante secarlos bien y pasar etanol por toda la superficie de la botella/ tubo antes de meterlos en la campana.

El exterior de las placas que contienen el cultivo es estéril en un principio, pero en el momento que las sacamos de la campana y las movemos al incubador, las tenemos que mantener limpias al máximo:

→ Tocar las placas con guantes o las manos bien limpias y etanolizadas. Depositad las placas sobre una bandeja en el interior del incubador. Cuando las miramos al microscopio, tenemos que asegurarnos que la platina está desinfectada y limpia. Finalmente acordaros de coger las placas con delicadeza (evitando movimientos que puedan derramar el medio o hacer que entre en contacto con la tapa), pero con firmeza al mismo tiempo para asegurarnos que la tapa no se abre de forma accidental fuera de la campana.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 14 de 16

## 9. INSTRUCCIONES EN CASO DE CONTAMINACIÓN:


- Si se contamina un cultivo celular, anotarlo en el **registro de contaminaciones (P-CC-10)**.
- Eliminar el cultivo:
  - Añadir lejía 70% a la placa.
  - Dejar actuar 10 min.
  - Aspirar el líquido.
  - Tirar la placa en el contenedor de residuos negro.

## 10. CONTROL DE *Mycoplasma* EN LÍNEAS:

- El micoplasma es una bacteria que pertenece a la familia de los *Mollicutes* que incluye más de 180 especies distintas, pero en cultivos celulares el 95% de estas son, *M. orale*, *M. arginii*, *M. fermentans*, *M. salivarum*, *M. hyorhinae* y *A. laidlawii*. Es el organismo que se autoreplica más pequeño con una medida de entre 0.2-0.8µm. No tiene pared celular y acostumbra a estar pegado a la superficie de la membrana celular de otros organismos aprovechándose de sus huéspedes para absorber nutrientes. En la naturaleza se encuentra como parásito en los humanos, mamíferos, reptiles, insectos y plantas.
- El micoplasma crece poco a poco, no mata las células, pero afecta distintos parámetros celulares como un aumento a la sensibilidad de inductores de apoptosis, aberraciones cromosómicas, disrupción de la síntesis de DNA, alteraciones en la eficiencia de las transfecciones, inhibición del crecimiento celular, etc.

Con el fin de garantizar que las salas de líneas se encuentren libres de *Mycoplasma*, se realizan controles periódicos en los que se testan las líneas con las que trabajan los usuarios. Para poder llevarlos a cabo los usuarios deben facilitarnos las muestras siguiendo este protocolo:

- Recoger el sobrenadante de cultivos celulares que haya podido estar al menos 48h en contacto con las células (preferiblemente 72h). No se aceptarán muestras infectadas con virus. Controlad que los tubos estén bien marcados por el usuario.
- Rellenar la **hoja de solicitud (P-CC-2)** y entregado vía e-mail o descargado de la pág. Web del IRBLleida (<http://www.irblleida.org/es/servicios-cientifico-tecnicos/cultivos-celulares/>). Y hacérselo llegar a través de correo electrónico:
  - Nombre línea
  - Tipo celular
  - Origen (stocks, mantenimiento,...)
  - Nombre de la persona y grupo
  - Data de recogida
- El análisis por PCR se realizará una vez por semana.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 15 de 16


- El resultado se hará saber vía e-mail. Si el resultado es positivo y en caso que el usuario no opte por destruir las células, los técnicos del SCC están autorizados para exigir el traslado de la línea celular a la sala adecuada de primarios.

## **11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍAS E INCIDENCIAS:**

- Si ocurre cualquier incidencia, anotarla en el **registro de incidencias (P-CC-09)**, enviar un e-mail o llamar al **teléfono de incidencias 12953 o 664340756**.
- Si se trata de una incidencia de **resolución urgente**, comunicarla directamente a los técnicos de laboratorio o a la responsable del SCT vía ext. telefónica o vía teléfono de incidencias 12953 o 664340756.
- Los técnicos de laboratorio tomarán las medidas oportunas y harán un seguimiento de la resolución.
- Si te encuentras solo en ese momento, mira si hay alguna actuación que pudieras hacer que evitaría daños mayores, p.ej. si un incubador se estropea, mover todas las placas de todos los usuarios de ese incubador a uno que funcione correctamente.

## **12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:**

- **NORMA GENERAL:** la mayoría de los agentes de riesgo manipulados (VHB, VIH, micoplasma) se inactivan con lejía (hipoclorito sódico). Además, en función del agente también se inactivan con alcohol o jabón. En consecuencia:
- **SOBRE SUPERFÍCIES:** aplicar lejía, dejar actuar unos 10-15 min. y secar con papel de filtro que se tirará al contenedor de bioseguridad (azul), después desinfectar con etanol al 70%.
- **SOBRE LA PIEL, ROPA O SUPERFÍCIES NO RESISTENTES:**
  - Primero sacar la ropa.
  - Lavar con agua corriente sin frotar la piel.
  - Aplicar jabón de manos y aclarar largamente con agua corriente.
  - Desinfectar con etanol al 70%.
  - Si se trata de una herida abierta lavar con agua y jabón y a continuación aplicar solución yodada y apósito.
- **FINALMENTE:**
  - SI ES NECESARIO, LLAMAR AL SERVICIO DE EMERGENCIAS (telf:112) y/o IR A LA MÚTUA INDICADA DEPENDIENDO DE LA ADSCRIPCIÓN AL IRB O UDL
  - NOTIFICALO A LOS RESPONSABLES DEL SCT Y RELLENAR UN FORMULARIO DE NOTIFICACIÓN DE ACCIDENTES.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edición:3	Mod: 0	Fecha ed. o mod.: 14-10-2018	Pág 16 de 16

## ANEXO I. Tareas de mantenimiento de los aparatos y de los laboratorios

- Las campanas de flujo laminar se han de desinfectar a fondo una vez al año. Éstas pasan una revisión del flujo y del nivel de partículas anual. Su superficie y paredes se han de limpiar y desinfectar con alcohol cada vez que se utilicen.
- La **campana de hipoxia** pasa una revisión una vez al año. El oxígeno debe calibrarse una vez al trimestre.
- Los **laboratorios de cultivos** deben tener una limpieza básica diaria, así como una de más profunda una o dos veces al año para minimizar la acumulación de polvo y otras partículas.
- Los **tanques de nitrógeno líquido** se deben revisar periódicamente asegurando una fase líquida y una de vapor dentro de los tanques donde se guarden las células. Éstos se rellenarán en función de las necesidades.
- Los niveles **de gases de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y aire sintético** se tienen que revisar periódicamente para asegurar el suministro a los incubadores y a la cámara de hipoxia.
- **El incubador** debe recibir CO<sub>2</sub> a una presión de 0.8-1.5 bares. Hay que desinfectarlos a fondo (cambio de filtros, desmontaje...) una o dos veces al año o en función de la necesidad. Durante el resto del año hay que limpiar la base, las puertas y la bandeja de agua periódicamente.

Los baños se tienen que limpiar periódicamente con agua y jabón y rellenarlos hasta cubrir la resistencia con agua destilada. El cabezal del baño, si suena la alarma puede ser por sobrecalentamiento, hay que añadir más agua al baño y hacerle un reset al cabezal (botón pequeño en la parte trasera al que hay que acceder con una punta de bolígrafo).

- Las **lámparas de los microscopios**, lupas y lámparas de fluorescencia se tienen que cambiar cuando se funden o cuando han sobrepasado su número máximo de horas de vida. En ese momento se tienen que revisar los microscopios y comprobar que las nuevas lámparas están bien centradas.
- Para cualquier incidente o avería se tiene que contactar con el servicio técnico del aparato en concreto.