

ÍNDICE

1. OBJETIVO	2
2. ÁMBITO DE APLICACIÓN	2
3. INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD	2
4. ACCESO A LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES	3
5. NORMAS BÁSICAS DE LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES	4
6. RESERVAS DE LAS SALAS DE CULTIVO CELULAR.....	5
7. INSTRUCCIONES DEL USO DEL EQUIPAMIENTO.....	6
8. GESTIÓN DE LOS RESIDUOS BIOLÓGICOS.....	11
9. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES.....	12
10. TAREAS DE MANTENIMIENTO DE LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES.....	16
11. CONTROL DE MICOPLASMA EN LÍNEAS CELULARES.....	18
12. CONSIDERACIONES SOBRE EL TRABAJO CON VECTORES VIRALES.....	19
13. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍAS E INCIDENCIAS.....	22

Redactado por:

Guillermo García Lainez
Responsable Unidad Cultivos Celulares



Fecha y Firma: 04/01/2019

Fecha de vigencia: 07/01/2019

Fecha próxima revisión: 07/01/2020

Fecha	Edición	Modificaciones
04/01/2019	01	Actualización de la Normativa de la Unidad de Cultivos Celulares. Sustituye a la Normativa elaborada en el Año 2015.

1. OBJETIVO

Dar a conocer la estructura de la Unidad de cultivos celulares del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), las normas básicas de trabajo relativas a bioseguridad, gestión de residuos y de uso de los aparatos, así como las personas responsables a quién dirigirse en caso de averías en la infraestructura, contaminaciones en los cultivos celulares o posibles accidentes en las instalaciones.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento aplica a todo el personal de laboratorio que sea usuario de la Unidad de cultivos celulares del IIS La Fe, cualquiera que sea su relación con el IIS La Fe (estudiantes, becarios, personal técnico e investigador, socio empresarial del Biopolo, etc...).

3. INTRODUCCIÓN DE LA UNIDAD

La Unidad de cultivos celulares es una unidad de apoyo a la investigación integrada en la Plataforma de Biología Celular del IIS La Fe que proporciona soporte científico-técnico a los Grupos de Investigación del IIS La Fe y empresas instaladas en el Biopolo La Fe que requieren experimentación ex vivo con modelos celulares (cultivos primarios obtenidos a partir de tejidos humanos y animales de experimentación o líneas celulares establecidas por inmortalización) para el desarrollo de sus proyectos de investigación garantizando la calidad de los resultados experimentales obtenidos en dichas instalaciones. La característica fundamental que define un laboratorio de cultivos celulares es el mantenimiento de la asepsia porque la tasa de crecimiento de células en cultivo de mamífero es muy inferior a la de los de los contaminantes habituales (hongos, levaduras y bacterias), por tanto, para el correcto mantenimiento del cultivo celular se requiere de una técnica experimental que evite la aparición de cualquier microorganismo no deseado.

La Unidad de cultivos celulares se encuentra ubicada en la Torre A del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y cuenta con dos laboratorios de cultivos celulares con control automatizado de temperatura, presión y humedad relativa por el Servicio de Ingeniería:

- Sótano: Unidad de Cultivos Celulares (6 Salas de cultivos celulares)
- 6ª Planta. Laboratorio 6.09 (4 Salas de cultivos celulares)

4. ACCESO A LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES

El horario de servicio con presencia del responsable de la Unidad es de lunes a jueves de 8:00h-17:00h y viernes de 8:00h a 15:00h. El acceso a la Unidad de cultivos celulares se encuentra restringido mediante la tarjeta identificativa del IIS La Fe y solo pueden entrar aquellos usuarios autorizados. Para entrar a la Unidad de cultivos celulares los usuarios deben pasar la tarjeta por el pomo situado en la puerta de entrada, que mostrará una luz verde, y a continuación, girar el pomo hacia la izquierda. Para la salida de la Unidad no es necesaria la tarjeta y únicamente hay que girar el pomo hacia la derecha. La tarjeta identificativa se debe recargar con una periodicidad semanal en los puntos de recarga de la tarjeta por todo el Hospital Universitario La Fe (el más cercano a la Unidad está en pasillo del sótano Torre B).

El acceso a la Unidad de cultivos celulares fuera del horario habitual de apertura del IIS La Fe (Lunes-Viernes 8:00-21:00) requiere de una autorización firmada por el responsable de la Unidad, disponible en la Intranet del IIS La Fe (Formulario FIT-IIS-002-05). En estas situaciones antes de acceder a la Unidad de cultivos se deberá comunicar con Seguridad para evitar que salten las alarmas instaladas en el sótano del IIS La Fe (Ext Telefónica: 244993).

Los datos de contacto del Responsable de la Unidad de cultivos son los siguientes:

Cargo	Nombre	Localización	E-mail de contacto	Ext
Responsable	Guillermo Garcia	Planta 0. Laboratorio 1	cultivos_celulares@iislafe.es	246710

Del mismo modo, todas las salas de cultivos de la Unidad de cultivos disponen de teléfono para poder comunicarse con los propios laboratorios de investigación, así como con Secretaría de Dirección, Celadores o el Responsable de la Unidad en caso de una emergencia.

- **Extensión: 411710** Sala de Cultivos Celulares 1
- **Extensión: 411711** Sala de Cultivos Celulares 2
- **Extensión: 411712** Sala de Cultivos Celulares 3
- **Extensión: 411713** Sala de Cultivos Celulares 4
- **Extensión: 411714** Sala de Cultivos Celulares 5
- **Extensión: 411715** Sala de Cultivos Celulares 6
- **Extensión: 412624** Salas Cultivos Celulares 6ª Planta

5. NORMAS BÁSICAS DE LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES

Todos los usuarios de la Unidad de cultivos celulares deben ser conocedores y cumplir la normativa básica que se expone a continuación. Para ello, el Responsable de la Unidad entregará copia de la normativa a cada usuario nuevo de las instalaciones. El Responsable notificará aquellos malos usos de las instalaciones a los usuarios con una periodicidad mensual con el objetivo de mejorar el funcionamiento en la Unidad y adquirir hábitos correctos durante el trabajo. Aquellos usuarios que incumplan reiteradamente la normativa verán restringido su acceso al interior de la Unidad.

1. En las instalaciones de la Unidad de cultivos celulares está prohibido comer, beber, masticar chicle así como almacenar alimentos o bebidas que sean de consumo humano.
2. No está permitido el acceso a la Unidad de cultivos con batas de laboratorio usadas del exterior. Las batas serán de uso exclusivo en la Unidad de cultivos y deberán permanecer en todo momento en su interior. Los usuarios optarán por utilizar su propia bata blanca de uso exclusivo, o las batas verdes de quirófano proporcionadas. Las batas usadas se depositarán en el canasto habilitado para ello en la entrada de la Unidad para su limpieza y posterior esterilización.
3. No está permitido el acceso al interior de la Unidad de cultivos y a las salas de cultivo con mochilas, abrigos, bolsos, etc. De forma excepcional se podrán guardar en el espacio habilitado en la entrada de la unidad mientras dure el trabajo del usuario en el interior de la Unidad.
4. Para acceder a las salas de cultivos es necesario el paso por varias exclusas. Para su apertura, se debe pulsar únicamente el botón de color azul y esperar hasta que la puerta se abra (cambia el color a verde). El sistema está configurado para que hasta una exclusiva no se cierre, la siguiente no se pueda abrir para evitar corrientes de aire debido a los diferenciales de presión. Únicamente está permitido pulsar ambos botones simultáneamente en caso de que la puerta no responda al botón azul y se encuentre bloqueada, o ante una emergencia.
5. Los guantes de trabajo son obligatorios durante la manipulación de los cultivos celulares. No se debe salir de la Unidad de cultivos celulares con los guantes puestos.
6. Las superficies de trabajo en las salas de cultivo se desinfectarán al principio y al final del trabajo con etanol o desinfectante para superficies después de retirar aquel material potencialmente peligroso (medio de cultivo, células, virus...). Del mismo modo, si por accidente o un mal uso los

usuarios ensucian cualquier instalación o equipamiento de la sala de cultivo deberán limpiarlo con la máxima brevedad posible para evitar causar afecciones en el resto de usuarios.

7. No está permitido sustraer cualquier tipo de material de una sala de cultivo (placas, pipeteador, gradillas, etc...) sin la autorización expresa del usuario propietario del mismo.
8. El Responsable de la Unidad de cultivos diseñará planes de limpieza periódica del equipamiento de cada una de las salas de cultivo y avisará con suficiente antelación a los usuarios. Para facilitar el trabajo, los usuarios evitarán la acumulación de material y reactivos de laboratorio innecesarios en el interior de las cabinas de bioseguridad, del baño termostático y las bancadas comunes.
9. Una vez finalizado el trabajo experimental, los tubos de aspiración se deben limpiar con lejía y etanol hasta que se neutralicen los líquidos contaminantes o medios de cultivo aspirados para evitar un crecimiento bacteriano en los mismos que suponga un posible foco de contaminación.
10. Al finalizar la jornada de trabajo, todos los equipos de las salas de cultivo deben apagarse. Prestar especialmente atención al baño termostático porque puede quemarse la resistencia y producirse un incendio, y a los microscopios ópticos invertidos, ya que la lámpara tiene una vida útil limitada.
11. El Responsable programará una limpieza de frigoríficos y congeladores comunes de la Unidad de cultivos celulares con periodicidad anual. En estas limpiezas, se retirarán aquellos reactivos que se encuentren en mal estado y no se encuentren identificados.

6. RESERVA DE LAS SALAS DE CULTIVOS

El Investigador que por primera vez desee trabajar en la Unidad de cultivos celulares contactará con el Responsable via e-mail (cultivos_celulares@iislafe.es) para una primera reunión donde se determinarán las necesidades del investigador. A continuación, el Responsable de la Unidad de cultivos asignará espacio suficiente en el interior de la Unidad (Cabina de Flujo Laminar, Incubador de CO₂, cajoneras, nevera 4°C y congelador -20°C) al Investigador o Grupo de Investigación en función de la carga de trabajo y las necesidades particulares asociadas al proyecto de investigación.

Para trabajar en la sala de cultivo asignada (Figura 1), los usuarios reservarán a través del Sistema de Reservas del IIS La Fe (<http://remote.iislafe.san.gva.es/mrbs/>) accediendo mediante el mismo usuario y contraseña del correo electrónico proporcionado por el IIS La Fe. Se recomienda que los

usuarios reserven únicamente el tiempo que consideren necesario para la realización de su trabajo experimental. En dicha reserva, la información mínima a añadir será la siguiente: Nombre, Laboratorio y Extensión Telefónica. El Responsable de la Unidad de cultivos anunciará en los calendarios de reservas tanto las tareas de mantenimiento en cada una de las salas, como otro tipo de eventos que impidan el uso de la Sala (cortes de luz, mantenimiento de equipos, etc...).

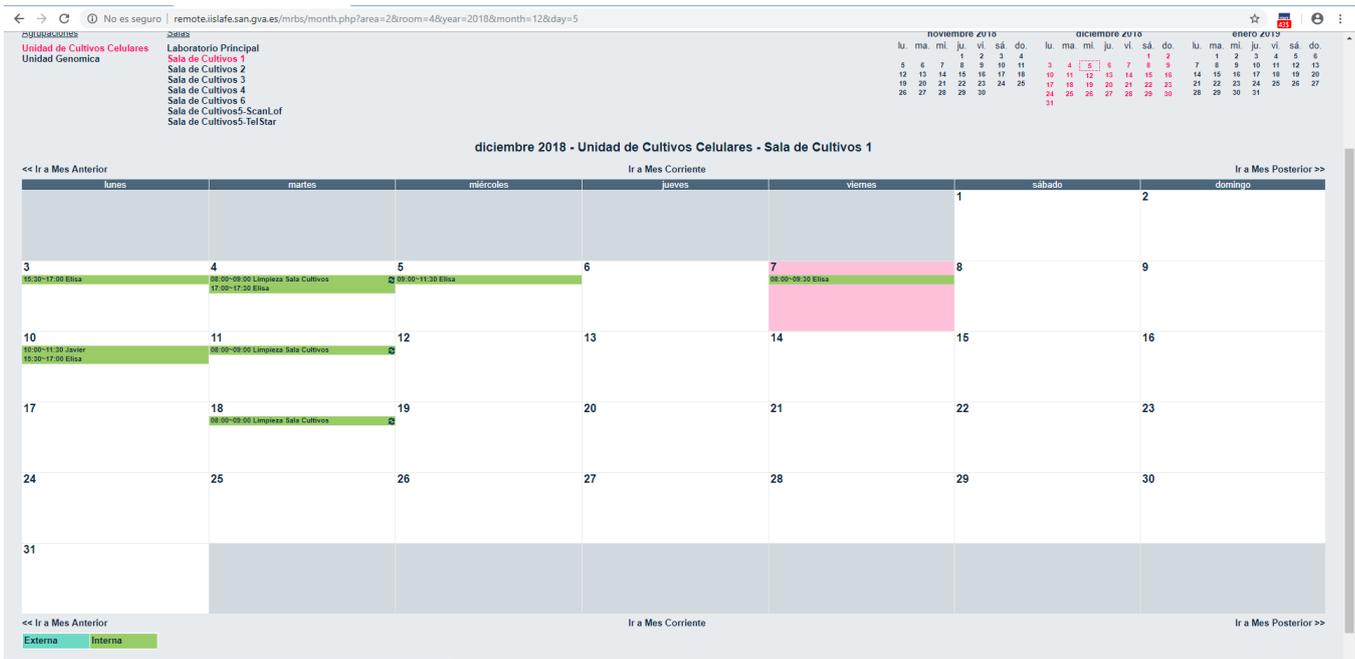


Figura 1. Sistema de reservas de la Unidad de Cultivos Celulares del IISLaFe.

7. INSTRUCCIONES DE USO DEL EQUIPAMIENTO

7.1 Cabina de Flujo Laminar

La función de la cabina de flujo laminar en la Unidad de cultivos es proporcionar un área libre de partículas y de posibles contaminantes (bacterias, levaduras, hongos, etc.) para poder trabajar con los cultivos celulares en condiciones de asepsia. La cabina de flujo laminar debe colocarse en una zona libre dentro del laboratorio, apartada de puertas y ventanas de tal manera que no sea posible caminar cerca del banco de trabajo ni detrás del usuario con el objetivo de evitar corrientes de aire que puedan provocar la introducción de posibles contaminantes en la cabina mientras se está trabajando. Las cabinas de flujo laminar de la Unidad de cultivos celulares (a excepción de la cabina de trabajo para células madre) son de flujo vertical con un nivel de bioseguridad IIA, protegiendo el producto, al propio usuario y al medio ambiente, por lo que son apropiadas para trabajar con modelos celulares que estén clasificados como un nivel de riesgo biológico 2.

Antes de empezar a trabajar en la cabina de flujo laminar

1. En caso necesario, limpiar el interior de la cabina de flujo laminar con el desinfectante apropiado. En la unidad disponemos de alcohol 70° (efecto inmediato, dejar secar) y limpiador de superficies *Sanit Surfa* (Cloruro de didecildimetilamonio, dejar actuar el tiempo recomendado antes de secar sin aclarar). Bajo ningún concepto se debe utilizar compuestos clorados (lejía) porque provocan la oxidación de la bancada de trabajo metálica.
2. Encender la cabina de flujo laminar y poner en marcha la luz ultravioleta durante 10-15 minutos antes de encender el ventilador. Se introducirá previamente todo aquel material con el que se desee trabajar: pinzas metálicas, cubres, etc. y que previamente no estén estériles. **Nota importante: La luz UV de las cabinas de flujo laminar son UVC germicidas de alta energía, por lo que se debe evitar encenderlas con la cabina de flujo laminar abierta.**
3. Apagar la luz UV, subir la ventana frontal hasta la posición de trabajo (aproximadamente 20 cm) o abrirla (según el modelo de cabina de flujo laminar) y encender la cabina en flujo normal. Es recomendable que la cabina funcione aproximadamente unos 5 minutos antes del inicio del procedimiento experimental para que la velocidad del flujo se haya estabilizado.

Durante el trabajo en la cabina de flujo laminar

Recomendaciones de trabajo en área estéril de la Unidad de cultivos celulares (Página 13).

Al finalizar el trabajo en la Cabina de Flujo Laminar

1. Recoger todo el material utilizado dejando la cabina de flujo laminar lo más vacía posible.
2. Los residuos generados durante el trabajo experimental se debe tirar al contenedor adecuado (Ver Sección Gestión de Residuos).
3. El tubo de aspiración de la bomba de vacío se debe desinfectar, primero con lejía y después con etanol hasta que no queden restos de medio de cultivo en el mismo (es un foco importante de contaminación), y el depósito de residuos líquidos vire a neutro (decolorado). Medio amarillo-blanco: lejía completamente activa, el medio se ha neutralizado. Medio naranja-rosado: hace falta añadir más lejía hasta que vire a un color amarillo-blanco.
4. Limpiar la superficie de trabajo con etanol y finalmente apagar el ventilador de la cabina de flujo laminar. En caso de que la cabina vaya a ser utilizada a continuación por otra persona, o para el trabajo con otra línea celular se recomienda encender las luces UV durante 10 minutos.

7.2 Incubadores de CO₂

El incubador de CO₂ es el equipo destinado al mantenimiento de los cultivos celulares y tejidos que simula las condiciones fisiológicas óptimas mediante la regulación exacta de temperatura, humedad relativa y concentración de CO₂ u O₂ en su atmósfera interior. Los gases requeridos para el servicio del incubador provienen de una fuente de suministro de gas centralizada (CO₂ y N₂). La presión recomendada en el manómetro del conducto de gases es de 1Pa, por debajo de esa presión el sistema electrónico del incubador es posible que no reconozca la presencia del gas.

De forma general, los incubadores de CO₂ de la Unidad de cultivos celulares están configurados con los siguientes valores, aunque pueden variar según el linaje del cultivo celular (hay que realizar una búsqueda bibliográfica antes de empezar el trabajo con una línea celular nueva):

- **Temperatura:** 37°C (Es la temperatura fisiológica de las células)
- **Concentración de CO₂:** 5% (v/v) (Necesario para la respiración celular)
- **Humedad relativa elevada:** Evita la evaporación del agua del medio de cultivo

Para el mantenimiento de los parámetros anteriores constantes, en el interior del incubador existe una bandeja con agua destilada autoclavada y un ventilador en la parte superior que recircula el aire distribuyéndose homogéneamente por los agujeros de los estantes metálicos.

Instrucciones de uso

1. Los usuarios depositarán en el interior del incubador asignado previamente por el Responsable de la Unidad los frascos o placas con los cultivos durante el tiempo que dure el procedimiento experimental. Si las placas son muy pequeñas, se recomienda utilizar bandejas (previamente autoclavadas) para facilitar su depósito y manipulación y evitar derrames en su interior o que se abran de forma accidental fuera de la cabina de flujo laminar.
2. Los usuarios deben tener la precaución de abrir la puerta del incubador el menor tiempo posible para no desestabilizar las constantes atmosféricas de su interior y no hablar mientras dura dicha operación (posible introducción de microorganismos). Del mismo modo, se evitará abrirlo cuando la puerta de la sala de cultivos se encuentre abierta (por las corrientes de aire).
3. La manipulación de las placas o frascos se debe realizar con cuidado para evitar derrames (que no se abra la tapa) y no pierdan la horizontalidad.

4. En caso de un derrame accidental sobre una estantería, se debe rociar el derrame con lejía diluida, a continuación secar con una toalla de celulosa y finalmente, desinfectarlo con etanol.
5. Cuando un cultivo celular se contamine, tendremos que retirarlo inmediatamente del incubador, y notificarlo al responsable de la Unidad de cultivos, según se describe en la Sección 9.
6. Durante el tiempo que esté en marcha un incubador el Responsable de la Unidad vigilará que el nivel de agua destilada del incubador sea el adecuado para mantener la humedad necesaria para el correcto mantenimiento de los cultivo. Periódicametne, se realizará reemplazará del agua del mismo por agua estéril para evitar el sobrecrecimiento bacteriano (periodicidad mensual).

7.3 Microscopios Ópticos

Los microscopios permiten hacer el control morfológico de las células dentro del recipiente de cultivo.

1. Antes y tras la finalización de la visualización limpiar los oculares y la platina (donde depositamos la placa o el frasco a observar) con papel y etanol 70%, así evitamos problemas de diseminación de contaminaciones entre los usuarios y las células.
2. El usuario colocará la muestra encima de la platina, asegurándose de que la palanca de control del diafragma se encuentra completamente abierta. Después, seleccionará el objetivo deseado y enfocara utilizando el macro y el micro hasta que la muestra se vea nítida.
3. Si hay cualquier función que se desconozca, no se debe manipular el microscopio, se debe preguntar al Responsable de la Unidad de cultivos. Asimismo, en caso de intercambio de algún objetivo entre los microscopios, deben devolverse al mismo revolver donde estaban ubicados.
4. Los usuarios una vez que hayan finalizado la visualización del cultivo celular deberán apagar el microscopio óptico, con el fin de evitar que se quede encendido durante toda noche. En aquellas salas donde hay lámparas UV hay que dejar tapado el microscopio para su protección.

7.4 Baño Termostático

Los baños termostáticos permiten mantener volúmenes determinados de líquidos a temperaturas controladas. Este equipo dispone de un fondo protector de la resistencia calefactora, lo que permite la colocación de vasos, gradillas, etc... para su calentamiento. En la Unidad de Cultivos Celulares se utiliza habitualmente para atemperar los medios de cultivo o soluciones a una temperatura de 37°C, durante el proceso de descongelación de cultivos celulares o el proceso de descomplementación del suero.

1. 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). Nunca encender el baño termostático sin agua porque la resistencia se puede sobrecalentar y provocar un incendio en el interior de la Unidad.
2. Encender el baño termostático y seleccionar la temperatura deseada (tarda aproximadamente unos 10 minutos en llegar a la temperatura de 37°C).
3. Una vez finalizada la operación de calentamiento y no haya ni tubos, ni botellas en su interior, el baño termostático debe apagarse para evitar que siga evaporándose el agua destilada.

7.5 Centrífugas

En la Unidad de cultivos la centrífuga se utiliza principalmente para sedimentar las células contenidas en un medio de cultivo biológico (centrifugación 1500 rpm durante 5 minutos) así como para la purificación de poblaciones celulares mediante gradientes de densidad.

1. Introducir el tubo o la placa dentro del adaptador del rotor y contrapesarlo con el mismo volumen en la posición simétrica del lado opuesto.
2. Elegir el programa adecuado (velocidad y tiempo de centrifugación) y poner en marcha el aparato.
3. Si se produce la rotura de un tubo dentro de la centrífuga, esperar un poco antes de abrirla para evitar respirar los aerosoles, desinfectar la zona manchada con lejía diluida en una toalla, dejar secar y finalmente, desinfectar con etanol 70%.

8. GESTIÓN DE LOS RESIDUOS BIOLÓGICOS

La gestión de los residuos se realiza en la Unidad de cultivos según se detalla en el Procedimiento Normalizado de Trabajo sobre la Gestión de Residuos del Hospital La Fe, segregando los residuos según queda resumido en la figura adjunta a este documento (Figura 2).

Cada sala de cultivos se encuentra dotada de un cubo de residuos con **bolsa gris** (Grupo II: Residuos sanitarios no específicos, papel y cartón), **un contenedor negro** (Grupo III: Material contaminado con restos biológicos: placas, pipetas) y **un contenedor amarillo** de objetos punzantes (Pipetas Pasteur). Todos los contenedores deberán permanecer en su ubicación correspondiente siempre con la tapa cerrada, evitando la acumulación de residuos en cualquier otra área de la sala de cultivos. Una vez alcanzado el 80% de su capacidad máxima, los contenedores serán sellados por parte de los usuarios de las Salas o del Responsable de la Unidad de cultivos y se sacarán a la entrada para su reemplazo. Del mismo modo, en el almacén de la Unidad de cultivos hay disponibles bidones para residuos líquidos: Soluciones Acuosas, Líquidos halogenados (cloro) y Líquidos No halogenados. Cuando se alcancé el 80% de su capacidad máxima, estos bidones se cerrarán y se sacarán a la entrada de la unidad para su reemplazo por el personal del Hospital La Fe. En la Entrada de la Unidad se dispone también de un **contenedor de color amarillo** para los envases.



Figura 2. Resumen esquema de la segregación de Residuos Sólidos Grupos I, II y III.

9. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

En un laboratorio de cultivos celulares es imposible trabajar completamente sin microorganismos. No obstante, se puede reducir su densidad analizando los posibles focos de origen (ambiente y propio usuario que realiza el procedimiento experimental) y adquiriendo unos hábitos rutinarios de trabajo que minimicen la aparición de contaminaciones en los cultivos celulares.

Principales tipos de contaminación

- **Contaminación por bacterias, hongos o levaduras:** La contaminación de los cultivos celulares por este tipo de microorganismos se comprueba rutinariamente observando los cultivos en el microscopio óptico invertido de contraste de fases (aumento 40X). De manera general, la contaminación debida a estos microorganismos provoca un cambio en el color (debido a una disminución de pH) y en la turbidez del medio de cultivo, lo que es fácilmente reconocible por el usuario. Algunos microorganismos, no alteran el color del medio de cultivo, pero la aparición de una mayor cantidad de debris o la aparición de puntos negros con un movimiento browniano serán indicativos de la presencia de una contaminación celular.
- **Contaminación por micoplasma:** Ver apartado contaminación por micoplasma.

Control microbiológico ambiental

Con respecto al propio ambiente, el responsable de la Unidad de cultivos realiza de forma periódica controles de calidad microbiológica del aire mediante aspiración o sedimentación, y controla de esta forma que no se superen los límites establecidos como aceptables para estas salas clasificadas (las Salas de cultivos celulares tienen una clasificación Tipo D). Con una periodicidad mensual, el Servicio de Limpieza realiza una limpieza de arrastre en profundidad de toda la Unidad de cultivos. Del mismo modo, si fuera necesario excepcionalmente previa solicitud con antelación se puede programar una limpieza con el robot de rayos UVC en una determinada sala de cultivos celulares.

A nivel usuario, se debe evitar abrir la puerta de la sala de cultivos mientras se está trabajando en su interior porque se pueden crear corrientes de aire involuntarias, alterando el flujo laminar de la misma, introduciéndose microorganismos en su interior. Del mismo modo, se debe respetar el correcto acceso a las salas a través de las exclusas para evitar generar grandes corrientes de aire hacia el interior de las salas de cultivo. **Se evitará entrar en grupo a las salas de cultivo, con un máximo**

de 2 personas por sala de forma simultánea. Además, se debe entrar en la Unidad de cultivos con el calzado lo más limpio posible, especialmente en el caso de días lluvioso (no meter barro, tierra, etc.), porque aunque el acceso a las salas dispone de alfombrillas adsorbentes que se recambian a diario y supone una ayuda para controlar el número de microorganismos, con gran suciedad estas pierden completamente su efectividad.

Recomendaciones de trabajo en área estéril de la unidad de cultivos celulares

Otras fuentes importantes de las contaminaciones que están presentes en los cultivos celulares son tanto el usuario como los hábitos de trabajo en el interior en la cabina de flujo laminar. A continuación se exponen recomendaciones que ayudan a minimizar la aparición de dichas contaminaciones.

1. Los usuarios deben estar provistos de los elementos de protección personal, bata limpia de uso exclusivo en la Unidad de cultivos celulares (puños cerrados), guantes y mascarilla (si fuera necesario) durante todo el tiempo de trabajo; ya que los principales focos de contaminación son la boca y las manos. Por esta razón, una vez que se está trabajando con el cultivo celular, no se debería ni responder al teléfono ni tocar puchos de las puertas o cualquier otra superficie (incluye el teléfono móvil) ni rascarse el pelo, nariz, brazo, etc... En caso de que se realice alguna de estas acciones, se deben desinfectar los guantes con etanol 70% antes de manipular el cultivo. Tampoco es aconsejable hablar mientras se trabaja en la cabina de flujo laminar porque se generan aerosoles que contienen microorganismos. Otro origen de contaminación son los accesorios, así pues, se debe trabajar con el pelo recogido y no llevar relojes o bisutería (anillos, pulseras, colgantes, etc.) así como otros complementos como bufandas, pañuelos, etc.
2. Todos aquellos reactivos y medios de cultivos que se vayan a introducir en la cabina de flujo laminar procedentes del baño termostático, se deben secar en primer lugar con una toalla de celulosa, y posteriormente, rociarlos con etanol por toda su superficie con otra toalla antes de introducirlos en cabina de flujo laminar. No utilizar la misma toalla para secar el agua y el etanol.
3. Abrir el material de un solo uso únicamente dentro de la cabina de flujo laminar. Todo el material y reactivos estériles no deben tocarse nunca con los dedos sin guantes. En caso de duda razonable (caja de puntas, tubo eppendorf, tubos de 15mL, PBS abierto fuera de la cabina, etc...) desechar el material y reemplazarlo por material estéril. Nunca devolver el material como pipetas

dentro del medio de cultivo o de las soluciones, si previamente ha sido introducido en la placa del cultivo celular. Es recomendable desechar la pipeta cada vez que se ha finalizado su uso.

4. Se debe trabajar preferentemente en la parte central de la cabina de flujo laminar, evitando que puedan quedar bloqueadas las rejillas de ventilación porque se reduce la eficacia del flujo laminar.
5. Todos los movimientos efectuados en el interior de la cabina de flujo laminar se deben realizar de forma suave y deben ser paralelos a la superficie de trabajo, evitando pasar los brazos o las manos por encima de cualquier material abierto (placas, tubos, medios), contengan o no el cultivo celular.
6. En caso de que sea necesario dejar un tapón de botella o tubo sobre la superficie de la cabina de flujo laminar, se debe dejar siempre hacia arriba y nunca pasar el brazo por encima de ellos. No obstante, es preferible ponerlo y quitarlo cada vez sujetándolo con la mano.
7. Para aspirar líquidos (PBS, medio de cultivos), se encenderá la bomba de aspiración y se conectará al tubo de aspiración una pipeta Pasteur de vidrio estéril, desechándola una vez finalizado su uso.
8. La parte exterior del frasco o placa petri que contiene el cultivo celular es estéril en un principio (cuando introducimos el paquete cerrado en la cabina de flujo laminar). No obstante, una vez que están salen de la cabina de flujo laminar para introducirlas al incubador, se deben mantener limpias. Los frascos con cultivos celulares se deben tocar únicamente con guantes. Cuando se miran los cultivos celulares en el microscopio óptico, hay que asegurarse que la platina esté limpia. Del mismo modo, se debe evitar derramar medio de cultivo o que éste entre en contacto con la tapa o el tapón y que los frascos o placas se abran de forma accidental fuera de la cabina de flujo laminar.
9. Los usuarios deben evitar generar aerosoles durante todo el procedimiento experimental.
10. Con el objetivo de que no se propague una contaminación los usuarios:
 - a) Utilizar medios y reactivos diferentes para cada tipo celular.
 - b) No compartir material ni reactivos con otros usuarios del mismo laboratorio (contribuye también a la propagación del micoplasma entre las líneas celulares).
 - c) Trabajar con más de una línea celular en la cabina al mismo tiempo.
 - d) No trabajar con un material que se sospeche que no sea estéril.

11. Los usuarios retirarán del área de trabajo del interior de la cabina de flujo laminar todo el material de plástico utilizado así como los residuos biológicos a medida que se vayan generando (cultivos celulares sobrantes, restos de tejido, sangre, etc.), para evitar su acumulación y se depositarán en el contenedor de residuos adecuado. Los usuarios evitarán dejar material sucio dentro del incubador, baño termostatzado, centrífuga o platina del microscopio de la sala de cultivos celulares.

En caso de que se produzca una contaminación

Si se contamina un cultivo celular se debe avisar al Responsable de la Unidad para anotarla en el registro de contaminaciones. Si el usuario lo desea se puede identificar la contaminación.

- Tomar una muestra de 1 mL de medio de cultivo contaminado en un tubo eppendorf para su envío al Servicio de Microbiología para su identificación.
- Neutralizar a continuación el cultivo añadiendo lejía al 70% al frasco o a la placa, y tirar la placa al contenedor de residuos biológicos negro.
- Los usuarios realizarán un control microbiológico de todos los medios de cultivo, soluciones y/o reactivos que estén relacionados con el cultivo celular contaminado para evaluar el alcance de la contaminación incubándolos durante un periodo de 24h en el incubador a 37°C. Transcurrido este tiempo se observará en el microscopio óptico la aparición de algún contaminante.

Ante una contaminación, en todos los casos se deberá evaluar el grado de extensión y el alcance de la contaminación, no obstante se recomienda lo siguiente:

-Contaminaciones puntuales provocadas por bacterias o levaduras: No será necesario tomar ninguna medida correctora adicional de las ya nombradas anteriormente.

-Contaminación generalizada provocada por bacterias o levaduras: Además de eliminar todos los medios y reactivos realizados con esos cultivos celulares, se procederá a la esterilización del incubador y pipetas, y una limpieza exhaustiva de la cabina de flujo laminar. Los cultivos no contaminados del mismo incubador se pondrán en cuarentena en otro incubador.

-Contaminación provocada por hongos: Los cultivos no contaminados se trasladarán a un incubador de cuarentena. Se procederá a la esterilización del incubador habitual de trabajo y a una limpieza exhaustiva de la cabina de flujo laminar. Bajo ningún concepto se introducirá un cultivo celular que haya estado en contacto con un cultivo celular contaminado con hongo en otro incubador "limpio" porque puede contener esporas, produciéndose su diseminación por el mismo.

10. TAREAS DE MANTENIMIENTO DE LAS SALAS DE CULTIVO

El Responsable de la Unidad de cultivos programará tareas de limpieza de cabinas de flujo laminar, baños termostáticos e Incubadores de CO₂ con una frecuencia semanal. Las tareas se programarán en coordinación con los usuarios de las salas de cultivo con la suficiente antelación para no afectar en el trabajo rutinario de investigación y preferentemente en horario de 8:00-10:00h y se pondrán consultar en la Plataforma de Reservas. En ausencia del Responsable de la Unidad las tareas de mantenimiento las realizarán los propios usuarios de las Instalaciones, siendo estos responsables del correcto uso y cuidado de los equipos.

Equipo	Horario
Baño Termostático	Lunes 8:00 h- 9:00h
Bomba de vacío	Lunes- Miércoles-Viernes 8:00h
Cabina de Flujo Laminar	Ver Tabla Salas 8:00h-9:00h

Baño Termostatizado

Se vacía el baño termostatizado y el agua se retira a la garrafa de residuos acuosos. A continuación, se limpia la superficie del baño con el producto de limpieza de superficies (Sanit Surfa o similar) y una toalla de celulosa, y finalmente, se deja secar la superficie metálica del mismo al aire. El usuario se encarga de llenar el baño termostático con agua destilada. Se puede añadir al baño termostatizado algún producto antimicrobiano para evitar su crecimiento. **En ningún caso se añadirá lejía al baño porque provoca la oxidación de la cubeta y de la resistencia.**

Bomba de vacío

Se vacía el colector de la bomba de vacío en la garrafa de residuos líquidos halogenados, se enjuaga con agua del grifo asegurándose de que no quede ningún sedimento (en caso de que hubiera) y finalmente se añaden varios mililitros de lejía en el colector antes de conectarla a la bomba de vacío. **Es importante que el colector nunca llegue a llenarse al 100% porque la bomba de vacío succionaría algo de líquido hacia el motor, provocando cortocircuito en el mismo y su rotura.**

Cabina de Flujo Laminar

Se desmonta la mesa de trabajo de la cabina de flujo laminar y se retiran todas las puntas de plástico y restos de pipetas pasteur de vidrio, y/o cualquier otro tipo de material que pueda haber en el fondo de la misma. En caso de que haya restos de sales en el fondo de la cabina se limpia la superficie en primer lugar con agua destilada. A continuación se aplica el desinfectante para superficies por toda la bancada y laterales de la cabina de flujo laminar y se extiende bien por todas las superficies, prestando especial atención a todas las esquinas y rincones porque son los puntos donde se puede acumular más polvo, siendo este un foco de contaminación. Después de dejar actuar el producto durante unos 5 minutos, se retira el exceso del mismo sin aclarar. Por último, se aplica el mismo procedimiento de limpieza a la mesa de trabajo metálica, primero limpiando los laterales y la parte interior, y una vez montada en la cabina de flujo laminar, su parte exterior. Si el usuario va a trabajar inmediatamente después de la limpieza, se encenderá la luz UV de la cabina de flujo laminar. **Nunca se utilizará lejía para limpiar la cabina de flujo laminar porque puede producir oxidaciones así como daño en los filtros internos de los mismos.**

Con el objetivo de una mejor coordinación entre el Responsable de la unidad de cultivos y los usuarios de las salas, se expone la siguiente tabla donde se detalla el día de limpieza de cada cabina:

Equipo	Horario
Sala de Cultivos 1	Martes 8:00h
Sala de Cultivos 2	Miércoles 8:00h
Sala de Cultivos 3	A demanda de los usuarios
Sala de Cultivos 4	Jueves 8:00h
Sala de Cultivos 5	Jueves 8:00h
Sala de Cultivos 6	Jueves 8:00h
Sala de Virus - 6ª Planta	Lunes 9:00h

En caso de que el día de mantenimiento sea día no laborable o festivo, se trasladará el mismo al día siguiente o anterior, en función de si cae a principios o final de semana.

Incubador de CO₂:

Tanto el Responsable de la Unidad de cultivos como los propios usuarios, vigilan que el nivel de agua del incubador de CO₂ se mantenga constante y limpia. En caso de que le falte agua, se añade sobre la bandeja agua destilada autoclavada o agua Brown. Se puede añadir por cada 1L de agua, 2 mL de bactericida/fungicida evitar el crecimiento de bacterias y hongos. Con periodicidad trimestral se realiza un autoclavado preventivo del incubador y la calibración de la concentración de CO₂ mediante el comprobador de CO₂ que se solicita al Servicio de Electromedicina del IISLaFe.

11. DETECCIÓN DE MICOPLASMA EN LAS LÍNEAS CELULARES

El micoplasma es una bacteria perteneciente a la clase de los *Mollicutes* (más 180 especies distintas), siendo los más frecuentes en cultivos celulares *M. orale*, *M. arginii*, *M. fermentans*, *M. salivarum*, *M. hyorhinis* y *A. laidlawii*. El micoplasma, con un tamaño de entre 0,2-0.8µm, es el organismo parásito más pequeño con capacidad de autorreplicación, no tienen pared celular y habitualmente se localizan en la superficie de la membrana celular de sus huéspedes para la absorción de sus nutrientes. A diferencia de otros contaminantes, el micoplasma no es observable a simple vista, no mata las células ni provoca cambios en el medio de cultivo, pero afecta a distintos parámetros celulares como un aumento de la sensibilidad a los inductores de apoptosis, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la eficiencia de las transfecciones, inhibición del crecimiento celular, etc. Por esta razón, con el objetivo de garantizar unos resultados experimentales fiables y de calidad, en la Unidad de cultivos celulares se realizan controles periódicos para su detección.

La detección de micoplasma se realiza de forma directa sobre el medio de cultivo que ha estado en contacto con los cultivos celulares que se desea evaluar mediante la realización de una qPCR utilizando cebadores específicos de este microorganismo. Se realizará el Test de Micoplasma en los siguientes supuestos:

- Cada vez que un laboratorio adquiere una línea celular nueva, en especial, si proviene de otro laboratorio exterior al IIS La Fe, y el investigador no dispone certificado de calidad.
- Cuando se crea un banco de trabajo de líneas celulares. Una vez que el investigador ha verificado que una línea celular se encuentra libre de micoplasma, se recomienda realizar un stock de viales a partir de ese cultivo para su congelación y almacenamiento.

- De forma rutinaria en aquellas líneas celulares con las que un grupo de investigación trabaja habitualmente y siempre que se descongele un vial no verificado de células para la realización de experimentos, especialmente si se van a realizar experimentos de transfección.

Procedimiento de envío de muestra

- 1) Los cultivos celulares en los que se desea evaluar la presencia de micoplasma se crecerán durante aproximadamente 3 días en ausencia de antibiótico hasta alcanzar máxima confluencia (para que la sensibilidad del ensayo sea mayor).
- 2) Los usuarios recogerán en 2 tubos estériles 500 μ L de medio de cultivo y **se rotularán con letra clara y legible** de forma que permanezcan identificados durante todo el proceso con los siguientes datos: Nombre del cultivo celular, pase, laboratorio y fecha de la muestra. Los tubos estériles se depositarán en la gradilla rotulada para dicho fin localizada en el congelador -20°C situado en el pasillo distribuidor de la Unidad de cultivos celulares.
- 3) El Test de micoplasma se realizará aproximadamente una vez cada 15 días, en caso de que haya una mayor demanda de análisis por parte de los usuarios se podrá aumentar su frecuencia.
- 4) El resultado del Test de Micoplasma se enviará por correo electrónico a los usuarios.

12 . CONSIDERACIONES SOBRE EL TRABAJO CON VECTORES VIRALES

Definiciones

- **Vector viral:** Virus modificado mediante técnicas de biología molecular que hace de vehículo para introducir material genético exógeno en el interior de la célula. Estos virus normalmente son capaces de producir enfermedades en humanos y animales; pero han sido alterados eliminando aquellos genes involucrados en su replicación y capacidad como patógenos. Los vectores virales más utilizados son los adenovirus y lentivirus. Los vectores virales ofrecen claras ventajas en cultivos celulares cuando la transfección por métodos convencionales como lipofección o electroporación presenta una baja eficiencia.
- **Lentivirus:** Los lentivirus son miembros de la familia viral *Retroviridae* caracterizados por el uso de su transcriptasa reversa e integrasa para la inserción estable de su genoma en el genoma del hospedador. Los lentivirus tiene la capacidad de infectar tanto células en división como

quiescentes.). La transmisión de estos virus ocurre por penetración de la piel a través de punciones o absorción (cortes, abrasiones, dermatitis, heridas) o exposición de las membranas mucosa del ojo, nariz o boca.

- **Adenovirus:** Los adenovirus son virus pertenecientes de la familia viral *Adenoviridae*, no encapsulados de ADN bicatenario que tiene la capacidad de infectar tanto células en división como quiescentes. Los adenovirus son patógenos de la mucosa respiratoria, ocular y gastrointestinal. A diferencia de los vectores lentivirales, los adenovirus son muy estables.

Nivel de Bioseguridad

De acuerdo al Manual de Bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud, los vectores virales aunque carecen de ciertos genes necesarios para su replicación, pueden contaminarse con virus que tienen intacta la capacidad de replicación, generados por sucesos muy improbables de recombinación espontánea en las líneas celulares de propagación. A la hora de evaluar el nivel de Bioseguridad con el que se debe trabajar con un vector viral se tiene en cuenta, entre otros aspectos, el grado de delección de genes virales en el vector, el uso de sistemas minicomponentes, así como el título y el tropismo viral. De esta forma, a nivel global el trabajo con los principales vectores virales que se utilizan en las instalaciones de la Unidad de cultivos celulares requieren un Nivel de Bioseguridad Nivel 2. Ante una duda concreta sobre el nivel de bioseguridad, consultar con el Responsable de la Unidad de cultivos.

Recomendaciones de Trabajo

1. La puerta de la sala de cultivos donde se lleve a cabo el procedimiento experimental con vectores virales se colocará el cartel de “PELIGRO BIOLÓGICO: REALIZACIÓN DE EXPERIMENTOS CON VECTORES VIRALES. NO ENTRAR”; durante el transcurso del mismo hasta su finalización.
2. Todos los usuarios que trabajen con vectores virales en la Unidad de Cultivos Celulares deberán llevar como protección personal **dobles guantes de nitrilo**, batas de laboratorio de uso exclusivo en la Sala de vectores virales y mascarilla. La decisión de llevar mascarilla estará condicionada al procedimiento experimental que realice el técnico operador. En cualquier caso, estará prohibido llevar pantalones cortos, sandalias o cualquier tipo de calzado abierto.

3. No poner etanol en los guantes interiores antes de poner el segundo par de guantes porque el etanol los permeabilizaría. El segundo par de guantes debe ser sustituido cada vez que se vaya a usar equipamiento del interior de la sala de cultivos como centrífuga, baño termostático, incubador de CO₂, neveras, etc. y estos hayan estado en contacto con el vector.
4. Los usuarios evitarán durante el trabajo experimental el contacto mano-cara y todos aquellos movimientos que puedan generar aerosoles. Los usuarios tomarán especial precaución cuando se usen objetos punzantes como agujas o pipetas Pasteur, reemplazándolas por otros materiales equivalentes cuando sea posible.
5. La centrifugación de los cultivos celulares infectados con vectores virales se realizará utilizando contenedores perfectamente cerrados y sellados. Después de cada proceso, el usuario comprobará exhaustivamente que no se haya producido ningún derrame en el interior de la centrífuga.
6. Todos los líquidos que estén en contacto con los vectores virales (medio de cultivo, PBS u otras soluciones de trabajo) se inactivarán en el interior de la Cabina de Flujo Laminar con lejía al 70%. Se recomienda el uso de contenedores (tubos de 50 mL o botellas de medio de cultivo vacías), que se depositarán en el Contenedor negro para residuos biológicos una vez neutralizados. El color es un buen indicador para saber cuándo las soluciones han sido neutralizadas; debiendo tener estas un color blanco o amarillento, según se ha explicado previamente.
7. Todo el material sólido fungible de laboratorio que esté en contacto con los vectores virales durante el proceso experimental debe ser desinfectado mediante una solución de lejía (70%) preparada diariamente y estar al menos en contacto durante 15 minutos antes de su depósito en el contenedor correspondiente de residuos biológicos.
8. Las muestra biológicas se pueden sacar de la cabina una vez se ha lisado o fijado el cultivo. La superficie externa de las placas o frascos, que contengan las muestras se han de descontaminar pasando un papel con lejía, secar y posteriormente tratar con etanol al 70% antes de sacarlos de la sala de cultivos celulares.
9. En caso de que se produzca un derrame con medio contaminado, se cubrirá el medio con papel absorbente e inmediatamente se neutralizará con lejía concentrada durante 10 minutos, empezando por la parte exterior del derrame y terminando en la parte central del mismo. El papel

se recogerá en el contenedor de residuos contaminados y se desinfectará la superficie con etanol 70%. El usuario se retirará todos aquellos elementos de protección personal que se haya visto afectados por el derrame y serán reemplazados por otros nuevos.

- 10.** En caso de que se produzca un derrame en el rotor de la centrífuga, esperar un poco antes de abrirla para evitar respirar los posibles aerosoles y proceder según se ha explicado anteriormente.

13. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍA

En caso de que se produzca una avería en la Unidad de cultivos celulares se procederá a contactar, con el Responsable de la Unidad **Teléfono Ext: 246710**, vía e-mail **cultivos_celulares@iislafe.es** o en el despacho (Planta Baja, Laboratorio 1). En caso de ausencia del Responsable, y **únicamente en caso de una avería urgente** se contactará por este orden de prioridad con: **Responsable de Infraestructuras Ext: 491909** (infraestructuras@iislafe.es), **Secretaria de Dirección Ext. 246601** (secretaria@iislafe.es). Fuera del horario habitual, se deberá contactar con Celadores Torre A (Ext: 246700) o averías 24h del Hospital (244222) para averías de infraestructura.