

Instituto de la Grasa. CSIC  
 Campus Universitario Pablo de Olavide  
 Edificio 46. Ctra. de Utrera km 1. 41013 Sevilla  
 Tif.: 954 61 15 50  
 Fax: 954 61 67 90

## MANUAL DE BIOSEGURIDAD DE LA UNIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR DEL INSTITUTO DE LA GRASA (IG-CSIC)

### Índice

1. Objetivo, ámbito de aplicación y responsabilidades.....	2
2. Introducción de la Unidad.....	2
3. Acceso a la UBC-IG, control de personal y vigilancia médica.....	3
4. Normas básicas de la UBC-IG.....	3
4.1. Normas básicas de protección personal.....	3
4.2. Normas básicas de utilización de la UBC-IG.....	4
5. Gestión de residuos .....	5
6. Indicaciones de uso sobre las batas verdes de la UBC-IG.....	6
7. Normas de actuación en incidentes y contaminaciones.....	7
7.1. Contaminación de superficies .....	7
7.2. Contaminación de cultivos celulares.....	7
8. Recomendaciones de uso del equipo más comúnmente utilizado .....	9
8.1. Cabinas de flujo laminar.....	9
8.2. Incubadores de CO <sub>2</sub> .....	10
8.3. Microscopios ópticos.....	11
8.4. Baños termostáticos .....	11
8.5. Centrífugas .....	11
9. Mantenimiento de las salas de cultivo.....	12
9.1. Cabina de flujo laminar .....	12
9.2. Incubador de CO <sub>2</sub> .....	12
9.3. Baño termostático .....	12

Responsable Unidad Biología Celular del Instituto de la Grasa:	María Úbeda-Manzanaro Crespo Correo: <a href="mailto:mubeda@ig.csic.es">mubeda@ig.csic.es</a> Teléfono: 95 461 1550 (Ext: 360/357)
Fecha:	06/04/2022
Actualización de la Normativa de la Unidad de Cultivos Celulares. Sustituye a la normativa elaborada en 12/04/2018 (MC Millán)	

## **1. Objetivo, ámbito de aplicación y responsabilidades**

El objetivo del presente Manual de Bioseguridad de la Unidad de Biología Celular del Instituto de la Grasa (UBC-IG) es facilitar a los usuarios el procedimiento más adecuado para conocer las normas básicas de higiene y bioseguridad en los laboratorios de cultivos celulares, así como las normas de uso de dichos laboratorios y el resto de laboratorios en el conjunto de la UBC-IG. Su aplicación permitirá llevar a cabo un buen uso del equipamiento científico de infraestructura general por parte de los usuarios de la UBC-IG, cualquiera que sea su relación con el IG-CSIC (estudiantes, becarios, personal técnico e investigador,...).

La persona responsable del Laboratorio, bajo la supervisión de los Jefes de Departamentos y el Director del Centro, es la encargada del buen funcionamiento de la Unidad y del cumplimiento de las normas establecidas en el presente documento. Los usuarios de la UBC-IG, deberán leer y comprender las normas generales de uso de las infraestructuras del IG y de la UBC-IG en particular, cumpliendo sus fundamentos. Todo ello en el marco de las actividades que previamente se hayan concertado con su investigador responsable o tutor.

## **2. Introducción de la Unidad**

La UBC-IG está destinada a proporcionar infraestructura y apoyo técnico a la comunidad científica, para facilitar el uso de técnicas de cultivos celulares, técnicas de análisis celular y molecular (Citometría de Flujo, Western Blot, RT-qPCR) y la observación de muestras en microscopía óptica y de fluorescencia. Se encuentra ubicada en la tercera planta del Instituto de la Grasa (puerta 362) y consta de varios laboratorios (363-368).

- Cuenta con un nivel de bioseguridad 2 en sus instalaciones, lo que implica trabajar con microorganismos infecciosos del grupo de riesgo 2. Un agente biológico del grupo 2 es aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.
- El laboratorio de bioseguridad 2 (UBC-IG) está fundamentalmente indicado para el cultivo de células humanas y animales. Si alguien estuviera interesado en trabajar con bacterias u hongos deberá consultar con la persona responsable de la UBC-IG sobre las condiciones de cultivo.
- La utilización de virus y vectores estará restringida. En principio estará autorizado el uso de vectores que hayan pasado el visto bueno de la persona responsable de la UBC-IG.
- Con respecto al trabajo de investigación, recepción o transporte de muestras biológicas (sangre, plasma, animales o sus partes, etc.), se habrá de informar con antelación al responsable de la UBC-IG para la indicación de la documentación requerida y el protocolo de actuación según el tipo de muestra. Todas las muestras biológicas serán tratadas como potencialmente infecciosas.

### **3. Acceso a la UBC-IG, control del personal y vigilancia médica**

El acceso a la Unidad de Biología Celular se encuentra **restringido a aquellos usuarios previamente autorizados** y se realiza mediante la tarjeta identificativa y autorizada del IG-CSIC. Para entrar en la UBC-IG, los usuarios deben acercar la tarjeta al lector situado por encima del pomo de la puerta, lo que desbloqueará la puerta.

- Ningún usuario de la UBC-IG podrá utilizar las instalaciones sin haber firmado y entregado la “hoja de consentimiento informado del usuario” y sin haberse registrado en la “hoja de Usuarios del Laboratorio de Bioseguridad 2” para lo cual tendrá que consultar a la persona responsable de la UBC-IG.
- Los usuarios de la UBC-IG deben poseer la capacidad funcional para el desempeño de las tareas que le fueran encomendadas (vigilancia médica/vacunación hepatitis B).
- Los usuarios de la UBC-IG que vayan a manipular agentes biológicos del grupo 2 deberán acreditar su formación en bioseguridad 2 a la persona responsable de la Unidad.
- Las puertas de la UBC-IG se mantendrán cerradas. El acceso estará controlado mediante lector de tarjeta, sólo para personal autorizado. El horario de trabajo en la UBC-IG es de 9.00-18:00 h. El uso de los equipos de la UBC-IG, quedará registrado en la página web habilitada para ello. Si no está habilitada esa opción en la página web, se registrará en la hoja de usuarios.

### **4. Normas básicas de la UBC-IG**

Todos los usuarios de la UBC-IG deben ser conocedores y cumplir la normativa básica que se expone a continuación.

#### **4.1. Normas básicas de protección personal**

- Antes de entrar, lavarse las manos en el lavamanos habilitado en la esclusa (agua y jabón/etanol), y antes de salir, el personal se quitará los guantes y se lavará las manos después de las manipulaciones. El usuario es el responsable de que al acabar esté todo limpio y en orden.
- Es obligatorio utilizar ropa de trabajo específica en la sala de cultivos. Se usará en todo momento bata limpia de color verde situada en la esclusa de la UBC-IG y se dejará en la zona dispuesta para ello, para su uso exclusivo dentro de la misma (ver sección 6 para más detalle).
- Se usarán guantes protectores apropiados (marcado de riesgo biológico) para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto con sangre, líquidos corporales u otros materiales potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras o impactos.
- No se usará calzado sin puntera.
- Intentar no usar material o recipientes de vidrio para evitar cortes e impactos.

Sustituir por plástico si este estuviera disponible para la misma aplicación.

- Todos los usuarios deben de ser conocedores de los riesgos derivados o que pueden derivarse del uso particular de agentes químicos y biológicos en la UBC-IG.

#### **4.2. Normas básicas de la utilización de la UBC-IG**

- En las zonas de trabajo estará prohibido usar el móvil, comer, beber, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto, así como almacenar alimentos o bebidas de consumo humano o introducir mochilas, abrigos, bolsos, etc.
- Todas las manipulaciones con material biológico se realizarán en las cabinas. Se evitará el uso de mecheros y acumulación de materiales en el interior de las vitrinas para no romper el flujo laminar. Se evitará tapar la zona taladrada donde se apoyan los brazos para no romper el flujo frontal de protección.
- Todos los productos químicos puros o mezclas deben estar correctamente etiquetados según el Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo (INSST).

[https://www.insst.es/documents/94886/327446/ntp\\_726.pdf/c85ed1e7-e638-46af-ae76-e731419099ad](https://www.insst.es/documents/94886/327446/ntp_726.pdf/c85ed1e7-e638-46af-ae76-e731419099ad)

- Todos los procedimientos técnicos se practicarán de manera que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles y gotículas.
- El desecho de residuos se deberá de realizar en los contenedores apropiados dispuestos en la UBC-IG (sección 5. Gestión de residuos).
- Las jeringuillas y agujas hipodérmicas serán de un solo uso y solo se utilizarán si son absolutamente necesarias. Durante su utilización, se adoptará especial atención para evitar la autoinoculación y la generación de aerosoles. Nunca se separará la aguja de la jeringuilla después de su utilización, ni se intentará reencapsular la aguja, depositándose el bloque aguja-jeringuilla en el contenedor específico para punzantes (sección 5).
- Cuando se termine de trabajar en la sala, se recogerá todo el material utilizado, y se limpiarán las superficies con desinfectante (parasafe/virkon y etanol al 70%) y papel de bobina.
- Al finalizar la jornada de trabajo, todos los equipos de las salas de cultivo que no requieran estar encendidos, deberán apagarse. Prestar especialmente atención a los baños termostáticos porque puede quemarse la resistencia, y a las lámparas de los microscopios.
- Todos los derrames y accidentes se comunicarán de forma inmediata a la persona responsable de la UBC-IG, y se aplicará el protocolo de actuación según lo establecido la sección 7.
- Cuando se requiera la congelación o descongelación de células, consultar antes a la persona responsable de la UBC-IG. Será imprescindible la utilización de criotubos y cajas de gran calidad para la congelación a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para solicitar dicha actividad se comunicará mediante correo electrónico a la responsable de la unidad ([mubeda@ig.csic.es](mailto:mubeda@ig.csic.es)) la petición de las células y los viales usados, y

cuando se repongan los viales del cultivo habrá que proporcionar los datos de la identificación de la línea celular, fecha del cultivo, número de pase, concentración celular y la localización en el tanque de conservación (varilla, caja y número de posición de los viales en la caja), también por correo electrónico. Toda esta información se registrará en el inventario de células existente en la página web de la UBC-IG, que mientras se habilita, quedará anotado en un archivo de inventario que gestiona la persona responsable.

- Todo el material de incubadores y neveras debe estar identificado con nombre, fecha de pase, fecha de uso, cultivo, etc.
- El material fungible debe ser aportado por cada investigador. Además, cada grupo tendrá que aportar sus productos de limpieza (Tabla 1) en botellas o recipientes debidamente identificados con el nombre del grupo y el producto. Estos recipientes podrán ser almacenados en el armario del fregadero, haciéndose responsable cada grupo de su reposición y empleo. De la misma forma, cada usuario se responsabilizará de la limpieza y recogida del material empleado, evitando ocupar superficies comunes de trabajo con material que no se esté usando.

Desinfectante	Concentración	Tiempo de contacto	Utilización
Etanol	70 %	1 min	Superficies, excepto metacrilato
Hipoclorito sódico (lejía)	0,1 % (1.000 ppm)	10 min	Superficies, excepto acero inoxidable
Hipoclorito sódico (lejía)	1 % (10.000 ppm)	10 min	Vertidos o líquidos con carga orgánica, excepto acero inoxidable
Perasafe <sup>TM</sup>	1,62 % (16,2 g/L)	10 min	Superficies
Virkon <sup>TM</sup>	1 % (10 g/L)	10 min	Superficies

## 5. Gestión de residuos

De manera general, la gestión de residuos se realizará acorde al Manual de Gestión de Residuos de Laboratorio realizado por el Servicio de Prevención y Salud Laboral del CSIC, que está colgada en la intranet del IG, en la carpeta PRL/, Gestión de Residuos/, o en la siguiente dirección:

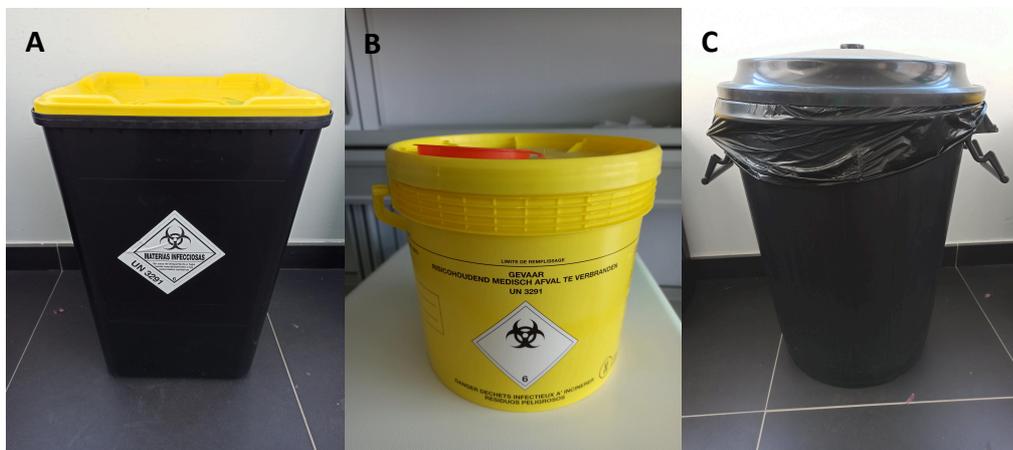
<http://www.ictp.csic.es/ICTP2/sites/default/files/10.Manual%20Residuos.pdf>

- Los residuos biosanitarios (no cortantes ni punzantes) potencialmente infecciosos deberán depositarse en los contenedores señalizados como residuos biosanitarios (contenedor negro con tapa amarilla o negra con la etiqueta de material infeccioso. Imagen 1.A).
- Los objetos cortantes y punzantes potencialmente infecciosos (agujas hipodérmicas, bisturís, cuchillas, vidrio roto, inyectables, etc.) se desecharán en recipientes a prueba de perforación dotados de tapaderas (contenedor redondo amarillo. Imagen 1.B).
- Los residuos biosanitarios líquidos se recogerán y se inactivarán con lejía al 1 % (Tabla 1). El color es un buen indicador para saber cuándo las soluciones han

sido neutralizadas, debiendo tener estas un color blanco o amarillento. Los residuos biosanitarios líquidos debidamente neutralizados se pueden desechar por el desagüe, lavando después el fregadero con agua para dejarlo limpio de salpicaduras de lejía.

- Los residuos sólidos no cortantes ni punzantes y no contaminados se depositarán en los contenedores negros sin señalización especial (contenedor asimilables a residuos urbanos. Imagen 1.C).
- Todos los contenedores deberán permanecer con la tapa cerrada en su ubicación correspondiente, evitando la acumulación de residuos en cualquier otra área de la UBC-IG. No llenar los contenedores más del 80 % de su capacidad máxima, momento en el que hay que notificar a la persona responsable de la UBC-IG para su sellado, retirada y reemplazo.

Imagen 1. Contenedores de residuos: A) Biosanitarios no punzantes; B) Biosanitarios punzantes; C) Asimilables a residuos urbanos (no contaminados).



## 6. Indicaciones de uso sobre las batas verdes de la UBC-IG

La esclusa de la UBC-IG es el lugar donde se encuentra la ropa de trabajo específica de la sala de cultivos (batas verdes) y es donde se ha de realizar el cambio de ropa, ya que no está permitido trabajar con las batas blancas en el interior de la UBC-IG.

Las batas limpias sin usar estarán depositadas sobre las baldas de la estantería de la antesala, con bolsa protectora de plástico. No colocar las batas una vez usadas en la estantería de nuevo.

El nuevo usuario cogerá una bata limpia de la estantería, le retirará la bolsa de protección y la desechará (no dejar las bolsas colgadas ni en las estanterías) y colocará una cinta adhesiva fácil de retirar con su nombre en el bolsillo superior de la bata. En su defecto también se le podrá colocar un papel con el nombre sujeto con una pinza o clip. No escribir el nombre con tinta directamente sobre la bata.

Una vez termine la tarea que vaya a realizar en la unidad, dejará la bata verde usada colgada de uno de los dos percheros ubicados en la antesala y la volverá a coger la misma bata para su próximo uso. Su uso es exclusivo de la unidad, así que no se saldrá de la UBC-IG con la bata verde.

Las batas se lavarán según el protocolo de limpieza de las batas de bioseguridad del IG y será gestionado por la responsable de la UBC-IG. Cuando el usuario considere que la bata está sucia (es recomendable que la frecuencia de lavado sea de 1 vez al mes para los usuarios frecuentes) o finalice su actividad en la UBC-IG (especialmente el personal temporal o de estancia), revisar que no quede nada en los bolsillos, retirar la identificación, y comunicar a la persona responsable de la UBC-IG que retire su bata para su limpieza.

## **7. Normas de actuación en incidentes y contaminaciones**

### **7.1. Contaminación de superficies**

En caso de derrames se utilizarán los medios de protección adecuados a cada caso: guantes, gafas, etc., y se emplearán los materiales y medios de descontaminación recomendados.

En vertidos poco significativos dentro de sistemas de contención (cabinas, incubadores, etc.), recoger el vertido con papel de bobina y añadir desinfectante.

La descontaminación se realizará de la siguiente forma:

- Recoger el vertido utilizando agentes humectantes/absorbentes (papel de bobina).
- Rociar la superficie con germicida (Virkon/Perasafe) y dejar actuar tiempo suficiente (Tabla 1).
- Secar con papel de bobina y volver a rociar con etanol al 70 %.
- Todo el material utilizado en la descontaminación, se gestionará como residuo biosanitario.

### **7.2. Contaminación de cultivos celulares**

Si se contamina un cultivo celular, los usuarios, además de eliminar todas las posibles fuentes de contaminación que pudieran afectar al resto, deberán de comunicarlo al responsable de la UBC-IG para que extirpe la limpieza de los equipos afectados y se avise de la posible contaminación al resto de grupos que trabajen en las salas.

A continuación se exponen recomendaciones que ayudan a minimizar la aparición de las contaminaciones:

- Los propios usuarios son focos de contaminación, sobre todo a partir de las manos y boca, por lo que deben estar provistos de elementos de protección personal durante todo el tiempo de trabajo (bata de uso exclusivo de la UBC-IG, guantes, etc.). Por lo tanto, una vez que se está trabajando con el cultivo celular, no se debe tocar pomos de puertas, superficies externas de la cabina, teléfonos, rascarse, etc., y siempre es recomendable desinfectarse los guantes con etanol al 70 % antes de manipular el cultivo. Tampoco es aconsejable hablar mientras se trabaja en la cabina, ya que se generan aerosoles que contienen microorganismos. Otra fuente de contaminación son los accesorios, por lo que no se debe trabajar con relojes o complementos (anillos, pulseras, colgantes, bufandas, pañuelos, etc.), y además se debe trabajar con el pelo recogido si se tiene largo.

- Todos los reactivos y medios de cultivo que procedan de un baño termostático y se hayan de introducir en una cabina de flujo laminar, se deben secar previamente con papel de bobina, y posteriormente, rociarlos con etanol al 70 % con otro papel antes de introducirlos. No utilizar el mismo papel para secar el agua y el etanol.
- Abrir el material de un solo uso únicamente dentro de la cabina de flujo laminar. Todo el material y reactivo estériles no deben tocarse nunca con las manos sin guantes. En caso de duda razonable, desechar el material y reemplazarlo por material estéril. Una vez que el material estéril ya ha sido introducido en una placa de cultivo celular, no volver a tomar medio de cultivo o solución con ella. Es recomendable desecharlo cada vez que ha finalizado su uso.
- Preferentemente se debe trabajar en la parte central de la cabina, evitando bloquear las rejillas de ventilación porque se reduce la eficacia del flujo laminar.
- Los movimientos efectuados en el interior de la cabina deben realizarse de forma suave y 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.
- En caso de que sea necesario dejar un tapón de botella o tubo sobre la superficie de la cabina, se debe dejar siempre hacia arriba y nunca pasar el brazo por encima de ellos. Lo preferible es ponerlo y quitarlo cada vez sujetándolo con la mano.
- La parte exterior del frasco o placa 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 salen de la cabina para introducirlas en el incubador, se deben mantener limpias. Los frascos con cultivos celulares se deben tocar únicamente con guantes. Cuando se miran los cultivos en el microscopio óptico, hay que asegurarse de que la platina esté limpia. Del mismo modo, se debe evitar derramar medio de cultivo o que este 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.
- Los usuarios deben evitar generar aerosoles durante todo el procedimiento experimental.
- Para que no se propague una contaminación, los usuarios deben utilizar medios y reactivos diferentes para cada tipo celular, no compartir material ni reactivos con otros usuarios, no trabajar con más de una línea celular en la cabina al mismo tiempo, y no trabajar con un material que se sospeche que no sea estéril.
- Los usuarios retirarán del área de trabajo del interior de la cabina 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 termostático, centrífuga o platina del microscopio.

## **8. Recomendaciones de uso del equipamiento más comúnmente utilizado**

### **8.1. Cabinas de flujo laminar**

Las cabinas de flujo laminar proporcionan un espacio libre de partículas y posibles contaminantes (bacterias, levaduras, hongos, etc.) para poder trabajar con los cultivos celulares en condiciones asépticas. Es recomendable que estén situadas en zonas libres de corrientes de aire y de paso de otras personas, para evitar corrientes que puedan introducir posibles contaminantes en las cabinas durante el tiempo de trabajo.

- Encender la cabina de flujo laminar y poner en marcha la luz ultravioleta durante 15-20 minutos antes de encender el ventilador para la totalidad esterilidad. La luz UV de las cabinas son UVC germicidas de alta energía, por lo que se debe evitar encenderlas con la cabina de flujo abierta. La luz UV deberá estar apagada cuando la sala esté ocupada, para proteger los ojos y la piel de exposiciones involuntarias, por ello, cuando la sala esté vacía y se encienda la lámpara UV, se deberá encender la señal luminosa colocada en la entrada de cada uno de los laboratorios de bioseguridad. Al finalizar, deberemos apagar la señal luminosa indicando a los usuarios que no existe peligro de radiación UV.
- Después de apagar la luz UV, subir la ventana frontal hasta la posición de trabajo (aproximadamente 20 cm) o abrirla, según el modelo, y encender la cabina en flujo normal y luz blanca. Es recomendable que la cabina funcione aproximadamente unos 5 minutos antes del inicio del procedimiento de trabajo para que la velocidad del flujo se estabilice.
- Antes de empezar a trabajar en las cabinas, es necesario limpiar el interior con el desinfectante apropiado. Se puede utilizar un limpiador de superficie como virkon o perasafe y/o etanol al 70 % dejándolos actuar durante el tiempo recomendado (Tabla 1). Nunca utilizar compuestos clorados como la lejía, ya que producen la oxidación de las superficies metálicas.
- Todos los artículos que entren en la cabina, deben tener su superficie descontaminada con etanol al 70 % y secados con papel de bobina.
- No introduciremos ningún tipo de documento escrito dentro de las cabinas.
- Durante el trabajo en la cabina de flujo laminar, se seguirán las recomendaciones y normas básicas expuestas en la sección 4 de este manual.
- Tal y como se expone en la sección 4, los derrames de medio o productos a través de las perforaciones de las planchas de metal de la superficie de trabajo de las cabinas, deben ser comunicados a la persona responsable de la UBC-IG, y deberán ser limpiados por el usuario siguiendo el protocolo de actuación (sección 7), antes de dar por finalizado su trabajo en la cabina. Los derrames no limpiados son fuente de contaminación.
- Al finalizar el trabajo, se debe retirar todo el material utilizado, dejando la cabina lo más vacía posible. Los residuos generados durante el trabajo se

deben desechar de la manera más adecuada (Ver la gestión de residuos en la sección 5). Se debe limpiar la superficie de trabajo con etanol al 70 % y finalmente, apagar el ventilador de la cabina. Se recomienda encender la luz UV durante 10 minutos en caso de que la cabina vaya a ser utilizada a continuación por otra persona, o para el trabajo con otra línea celular.

## **8.2. Incubadores de CO<sub>2</sub>**

El incubador de CO<sub>2</sub> simula las condiciones fisiológicas óptimas para el mantenimiento de los cultivos celulares y tejidos, mediante la regulación de la temperatura, humedad relativa y concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en su atmósfera interior.

Los incubadores de CO<sub>2</sub> de la UBC-IG suelen estar configurados con los siguientes valores: temperatura de 37 °C (temperatura fisiológica de las células), concentración de CO<sub>2</sub> del 5 % (v/v) (para la respiración celular) y una humedad relativa elevada para evitar la evaporación del agua del medio de cultivo. Estos parámetros pueden variar según el linaje de cultivo celular con el que se trabaje (antes de empezar con una línea celular nueva, hay que realizar una búsqueda bibliográfica).

En el interior del incubador existe una bandeja con agua destilada autoclavada y un ventilador que recircula el aire homogéneamente en su interior, manteniendo así los parámetros de incubación constantes.

- Los usuarios depositarán los frascos o placas en el interior del incubador durante el tiempo que dure el procedimiento experimental. Si las placas son muy pequeñas, se recomienda utilizar bandejas (previamente esterilizadas) para facilitar su depósito y manipulación, y evitar derrames.
- La puerta del incubador debe estar abierta el menor tiempo posible para no desestabilizar las constantes atmosféricas de su interior. Se recomienda no hablar durante la apertura de la puerta ya que puede ser una posible fuente de introducción de microorganismos. También se evitarán abrirlo cuando las puertas de las salas de cultivos se encuentren abiertas o necesite pasar alguien cerca (por las corrientes de aire).
- La manipulación de las placas o frascos se debe realizar con cuidado para evitar derrames y no pierdan la horizontalidad.
- En caso de derrame accidental sobre una estantería, se debe proceder según las instrucciones de la sección 7.
- Cuando un cultivo celular se contamine, se retirará inmediatamente del incubador y se notificará al responsable de la UBC-IG.
- El usuario vigilará que el nivel de agua destilada del incubador sea el adecuado para mantener la humedad necesaria para el correcto mantenimiento del cultivo. En el caso de que existiera alguna anomalía, se notificará a la responsable de la unidad. Periódicamente, la responsable de la unidad, reemplazará el agua del mismo por agua estéril para evitar el sobrecrecimiento bacteriano (periodicidad mensual).

### **8.3. Microscopios ópticos**

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

- Antes de usar y tras la finalización de la visualización, limpiar los oculares y la platina con papel y etanol al 70 %, para evitar la diseminación de contaminaciones entre usuarios y las células.
- Si hay cualquier función que se desconozca, no se debe manipular el microscopio y se debe preguntar al responsable de la UBC-IG.
- Cuando la visualización del cultivo celular haya terminado, los usuarios deberán apagar el microscopio con el fin de evitar que se quede encendido durante la noche, asegurarse de que se haya dejado limpio y tapar con su funda para su protección y evitar la acumulación de polvo.

### **8.4. Baños termostáticos**

Los baños termostáticos se suelen emplear para atemperar los medios de cultivos o soluciones a una temperatura de 37 °C, durante el proceso de descongelación de cultivos celulares o el proceso de descomplementación del suero.

- Comprobar el nivel de agua del baño y en caso necesario, rellenarlo con agua destilada hasta un nivel adecuado (suelen tener marcas de nivel máximo y mínimo). Nunca encender el baño sin agua porque la resistencia se puede sobrecalentar y quemar.
- Encender el baño termostático a la temperatura deseada y esperar a que alcance la temperatura (unos 10 minutos para 37 °C).
- Una vez finalizado su uso, retirar de su interior todos los tubos, botellas, etc., y apagarlo para evitar que se evapore todo el agua.
- Los baños se vaciarán y limpiarán periódicamente por la responsable de la unidad.

### **8.5. Centrífugas**

En la UCB se suelen emplear las centrífugas para sedimentar las células contenidas en un medio de cultivo biológico, así como para la purificación de poblaciones celulares mediante gradientes de densidad.

- Introducir el tubo o placa dentro del adaptador del rotor y contrapesarlo con el mismo volumen en la posición simétrica del lado opuesto.
- Elegir el programa adecuado (velocidad y tiempo de centrifugación) y poner en marcha el aparato.
- Si se produce la rotura de un tubo dentro de la centrifuga, avisar al responsable de la UBC-IG, esperar un poco antes de abrirla para evitar respirar aerosoles. El usuario deberá desinfectar la zona manchada con el desinfectante adecuado (Tabla 1), dejar secar y volver a desinfectar con etanol al 70 %.

## **9. Mantenimiento de las salas de cultivo**

En ausencia del responsable de la UBC-IG, las tareas de mantenimiento las realizarán los propios usuarios de las instalaciones, siendo responsables del correcto uso y cuidado de los equipos.

### **9.1. Cabina de flujo laminar**

Se desmonta la mesa de trabajo de la cabina y se retiran todas las puntas de plástico y restos de cualquier otro tipo de material que pueda haber en el fondo de la misma. En caso de que haya sales, primero se limpia la superficie con agua destilada. A continuación se aplica desinfectante adecuado por toda la superficie del fondo y laterales de la cabina de flujo laminar, prestando especial atención a las esquinas porque son los puntos donde se acumula más polvo, siendo este un foco de contaminación. Después de dejar actuar el producto durante el tiempo necesario, se retira el exceso del mismo sin aclarar. Por último, se aplica el mismo procedimiento de limpieza a la mesa de trabajo metálica (planchas de metal), primero limpiando los laterales y la parte interior, y una vez montada en la cabina, 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 y daño en los filtros internos.

### **9.2. Incubador de CO<sub>2</sub>**

Tanto el responsable de la UBC-IG como los propios usuarios, vigilan que el nivel de agua del incubador de CO<sub>2</sub> se mantenga constante y limpia. En caso de que falte agua, añadir sobre la bandeja agua destilada autoclavada. Se puede añadir bactericida/fungicida para evitar el crecimiento de bacterias y hongos.

### **9.3. Baño termostático**

Una vez desenchufado el baño, se procede al vaciado del agua. Se limpia la superficie del baño con un desinfectante adecuado (Tabla 1) y papel de bobina y se deja secar la superficie metálica al aire. El usuario se encarga de llenar el baño termostático con agua destilada. Opcionalmente, se puede añadir algún producto antimicrobiano para evitar la proliferación rápida de microorganismos en el agua. En ningún caso se añadirá lejía al baño porque provoca la oxidación de la cubeta y de la resistencia.