

Reglamento de uso y consideraciones generales del laboratorio de cultivo de células animales
(Aprobado por CoDep DBBE e IFIByNE; Septiembre 2009)

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE)

e

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET).

1. Especificaciones generales: organización y funcionamiento

El Laboratorio de Cultivo Celular (LCC) fue creado con el objeto de funcionar como cuarto de cultivo general -con espacio otorgado por el DBBE-, para uso principalmente de los investigadores/docentes del DBBE y del IFIBYNE, así como investigadores de otros departamentos de la FCEN en caso de necesidad.

En el Laboratorio de Cultivo Celular se pueden realizar, cumpliendo las normas establecidas en este documento, procedimientos experimentales de cultivo de órganos, cultivos primarios y cultivo de embriones, como así también preparar medios de cultivos y/o otros materiales, soluciones de trabajos y/o muestras que requieran cierta esterilidad o incubación en estufa de cultivo.

Descripción general y contenido

El LCC consta de 2 cupulines con salida al pasillo interno (laboratorio 71B, 4to. Piso, lado Arquitectura), que está provisto de una mesada y una piletta con agua corriente fría y:

- mesada con: mechero, alcohol 70%, espadol, povidona, lavandina al 10%, papel común, papel de arroz, algodón.
- .- Estufa de cultivo
- Tubo de Gas comprimido con válvula
- Microscopio
- Banquetas
- Botiquín de primeros auxilios

Restricciones

El LCC no cuenta hasta el momento con cabina de flujo laminar, por lo que se deben extremar las normas de limpieza y mantenimiento.

No se permite realizar cultivo de virus, bacterias u hongos, ya que los mismos requieren condiciones de mayor infraestructura y esterilidad (flujo laminar), que permita la preparación de las muestras y manipuleo sin reportar riesgos de contaminación.

No se permitirá el trabajo con material biológico patógeno-peligroso de ningún tipo (ni animal ni vegetal), ni radioactivo de ningún tipo.

Al momento de su uso se deberá adecuar la limpieza de la mesada con productos apropiados para tal fin y se deberá utilizar un mechero encendido durante el procedimiento de trabajo en el área de mesada a utilizar. También, según el caso, se podrá o deberá usar barbijo de protección para el usuario y para evitar contaminaciones del material o muestra a incubar.

2. Condiciones generales de uso y de la higiene y seguridad.

Se deberán respetar las normas de Higiene y Seguridad establecidas y aprobadas por la FCEN, como así también la distribución de espacio y equipamiento, organización y funcionamiento del trabajo. A tal fin se ha indicado los objetivos y procedimientos básicos generales de los distintos tipos de trabajos. Se deberán seguir los procedimientos adecuados para la preparación de medios de cultivo, materiales y equipos (estufa de cultivo, tubo de gas u otro equipo menor).

Para realizar los diferentes tipos de cultivos, el material y muestras a cultivar se podrán preparar dentro del cuarto, quedando prohibido el ingreso de animales vivos dentro del mismo, a menos que estén bajo anestesia general. Los mismos deben ser totalmente desinfectados en forma

externa con solución povidona, DG6 o similar, e ingresados envueltos en una servilleta de papel humedecida con desinfectante o dentro de una caja plástica limpia.

Relativo a los cultivos a desarrollar en el LCC, estos pueden ser:

- a. Cultivo de órganos
- b. Cultivos primarios
- c. Cultivos de embriones
- d. Otros: consultar al Ministro Responsable previamente

a) Cultivo de órganos

Son cultivos cortos de 24-48 horas de duración. Los órganos pueden ser preparados dentro del Laboratorio o fuera de su área en cuyo caso ingresarán dentro de recipientes estériles o limpios, para su posterior procesamiento en la mesada del LCC. En el caso de su introducción en la estufa de cultivo, se deberá utilizar una caja de plástico con tapa libre esterilizada con alcohol 70% para introducir en ella el material preparado.

b) Cultivos primarios celulares

Los cultivos primarios celulares se mantendrán en crecimiento durante poco tiempo (días o semanas). Las muestras podrán ser previamente preparadas fuera del LCC. Si se requiere preparación en esterilidad, dentro del cuarto, se podrá ingresar al cuarto equipos menores (microcentrífugas u otros) perfectamente limpias libres de polvo y rociadas con alcohol 70%, se deberá limpiar y esterilizar la mesada para tal fin y se deberá utilizar mechero encendido, también para esterilizar material de vidrio a usar. Se tomarán los resguardos necesarios para no dejar material ni residuos posteriormente al trabajo.

Durante el cultivo, si es requerido el cambio del medio, se deberá utilizar material descartable para tal fin y desechar adecuadamente los mismos posteriormente al uso, realizando lo mismo con el medio reemplazado. La extracción de las muestras se deberá realizar en condiciones máximas de limpieza y esterilidad, con el uso de mechero en mesada y en el caso de utilizar equipos de microscopia, estos deberán ser dejados en perfectas condiciones de limpieza. El material a utilizar para introducir las muestras en la estufa deberá ser estéril como así también los medios de cultivo.

c) Cultivo de embriones

Estos cultivos son de corta duración (días, hasta 1 semana). Los embriones se podrán extraer de los órganos reproductivos del animal. Los animales deberán ser previamente sacrificados y esterilizados como fue antes descrito, fuera del LCC y transportados en forma estéril al LCC. La extracción de las muestras se deberá realizar en condiciones de perfecta limpieza y esterilidad máxima, con el uso de mechero en mesada y en el caso de utilizar equipos de microscopia, estos deberán ser esterilizados y dejados en perfectas condiciones de limpieza. El material a utilizar para introducir las muestras en la estufa deberá ser estéril como así también los medios de cultivos. Las muestras deben ser extraídas periódicamente de la estufa para su evaluación, se adecuarán las condiciones de esterilidad y limpieza de mesada y microscopios a utilizar previamente de modo de evitar contaminaciones de la placa de cultivo.

3. Usuarios de Investigación

Cada grupo o usuario deberá especificar los datos y actividades en el **Libro de Registros** colocado en el LCC a fin de llevar un control del mantenimiento del mismo.

Los datos a completar son: Nombre completo del usuario, Nro. de Laboratorio, Departamento, interno, fecha y horario de uso del LCC; utilización de estufa de cultivo (Fecha/s: horario de uso, condiciones de uso: temperatura, humedad); Gas_(tiempo); tipo de cultivo/muestra (Tipo de trabajo que se realiza), Duración del cultivo, elementos contaminantes); Utilización de microscopio invertido (Fecha, Objetivo utilizado).

4. Mantenimiento del LCC y equipos

El LCC deberá ser mantenido en perfectas condiciones de limpieza y esterilidad. Para ello las **mesadas**, se mantendrán limpias repasándolas con un paño húmedo mojado en lavandina diluida al 10%. Para su uso se rociará con alcohol 70% y secará con papel. El **piso** deberá ser lavado con agua lavandina periódicamente y preferentemente se requerirá la limpieza antes del trabajo en su interior.

- Estufa de cultivo

El mantenimiento de la limpieza y esterilidad de la estufa de cultivo es muy importante. Para ello, antes de ser utilizada, los usuarios deben controlar la ausencia de elementos contaminantes en su interior, como así también observar el estado del agua destilada en la bandeja.

- Tubo de Gas comprimido

Los usuarios deberán controlar el nivel de llenado del tubo de gas y en caso de observar un mínimo nivel en los indicadores de presión de la válvula, deberán avisar al Ministro Responsable del LCC.

- Microscopio

Deberá ser mantenido libre de polvo en general, sin restos de material en la platina o placas de apoyo. La óptica deberá ser limpiada con papel de arroz, antes y luego de su uso.

5. Equipamiento disponible

Estufa gaseada

Marca: FAC, Industria Argentina. Con control de temperatura (Fabricante: Gustavo Kuklis). Modelo: E.G. 4060. Propiedad: IFIBYNE-CONICET.
Bandeja de acero inoxidable (Propiedad: UBACYT Dr. Enrique Rodríguez (11/6/2008).

Tubo de gas comprimido

Tipo de gas: carbógeno (5%CO₂-95% O₂). Adquirido en: Oxígeno Central SA. Fecha de compra: 13/5/2008. Propiedad: UBACYT Dr. Enrique Rodríguez. Carga: completa. Con cadena de sujeción a la pared.

Válvula para tubo de gas comprimido

Adquirido en: Oxígeno Central SA. Fecha de compra: 13/5/2008. Propiedad: UBACYT Dr. Enrique Rodríguez.

Microscopio invertido

Propiedad: IFIBYNE-CONICET. Marca: TCM 400, Labomed. Fecha de compra: octubre 2008.

Normas generales

1. El ingreso al LCC será restringido a las personas que estén realizando protocolos en el momento.
3. Queda estrictamente prohibido el ingreso de jaulas/cajas/recipientes con animales.
4. Queda estrictamente prohibido manipular animales vivos dentro del LCC.
5. Queda estrictamente prohibido manipular material radioactivo o patogénico-peligroso (animal o vegetal) de cualquier nivel de bioseguridad.
6. Los animales anestesiados o muertos que ingresen deberán ser esterilizados fuera e ingresar envueltos en papel con alcohol.
7. El descarte de animales deberá realizarse de inmediato luego de su uso, retirando los mismos del cuarto en bolsa roja. El descarte de residuos sólidos y líquidos será responsabilidad de cada usuario y deberá ser retirado inmediatamente del cuarto luego del procedimiento de trabajo. Cada usuario deberá proveerse de barbijos, guantes, y todo equipo de seguridad relacionado a su tarea, como así también material de limpieza (papel, algodón, alcohol, etc.) para la limpieza del espacio de uso.

8. Todo operador deberá usar material de su propiedad.
9. Se debe rociar la superficie de trabajo con alcohol 70% así como frascos, pipetas y demás materiales antes de utilizar.
10. Nunca dejar encendido el mechero si se ausenta del cuarto.

a. De los usuarios

1. El LCC se encuentra disponible para uso de los grupos de trabajo pertenecientes al DBBE y IFIBYNE, siempre y cuando dicho trabajo se adecue a las posibilidades que brinda el lugar. Con especial solicitud y tiempo, los usuarios de otros departamentos podrán hacer uso del LCC.
2. Todo usuario que desee utilizar el LCC por primera vez deberá comunicarse con el Ministro Responsable (nombre, interno y mail en la puerta del LCC o al final del presente reglamento) para informarse sobre el uso del mismo.
3. Cada vez que se use el LCC para realizar alguna tarea, cada usuario deberá OBLIGATORIAMENTE registrarse en el LIBRO DE REGISTROS el cual se encuentra en el interior del laboratorio.
4. El equipamiento del LCC es de uso gratuito. Los costos del mantenimiento periódico de limpieza y/o reparaciones serán *prorratedados por los usuarios del mismo*.
5. Al retirarse del LCC luego del trabajo, deben verificar que el mismo esté debidamente cerrado y con las luces apagadas.
6. Esta terminantemente prohibido realizar copias de la llave de acceso al LCC sin previa autorización de la Dirección del Departamento y del Ministro Responsable.
7. Los usuarios deben colaborar activamente con el Ministro Responsable del LCC y resolver de inmediato cualquier situación irregular que se detecte, comunicándose al mismo tiempo al Responsable.
8. Es de uso obligatorio un guardapolvo/delantal para tal trabajo. En lo posible, deberá ser de uso exclusivo para las tareas dentro del LCC.
9. Se aconseja el uso de guantes descartables. De lo contrario las manos deberán lavarse y rociarse con alcohol 70%, antes de hacer uso de la estufa de cultivo.
10. Después de trabajar cada usuario deberá dejar el lugar en condiciones de perfecta limpieza y orden para que pueda ser utilizado por un nuevo usuario.
11. Todos los usuarios deben atenerse a las normas y reglamentación del cuarto de cultivo. Todo director de grupo debe asegurarse que cualquier nuevo miembro de su equipo esté al tanto de las normas y reglamento de trabajo.

b. Uso de la estufa de cultivo

1. Para introducir elementos en la estufa, el usuario deberá lavarse y rociarse las manos con alcohol 70%.
2. Debe mantenerse cerrada y ser abierta el menor tiempo posible.
3. El material o muestras a introducir e incubar debe estar limpio y esterilizado con alcohol 70%.
4. La estufa deberá ser limpiada una vez por semana, con agua destilada.
5. Una vez finalizado el protocolo, desechar los medios de cultivo u otros materiales de la estufa. Los líquidos en bidón del LCC y los sólidos en bolsa que deberá ser retirada por el usuario al finalizar la tarea.
6. Controlar el contenido de gas del tubo.
7. Los frascos de cultivo, placas u otros deben mantenerse dentro de la estufa en caja de plástico con tapa no hermética que permita la difusión de gases. Es conveniente abrir las cajas cerca del mechero para extraer las muestras. La superficie a colocar los frascos o placas debe estar esterilizada.

c. De la Higiene y Seguridad del LCC

1. NO se pueden guardar ni almacenar sustancias químicas de ningún tipo dentro del LCC que no sea la propia permitida de uso común para tales fines.
2. El lugar deberá mantenerse ordenado, limpio y libre para el movimiento del trabajo.

3. No se debe bloquear la vía de salida con ningún elemento que la entorpezca.
4. Esta terminantemente prohibido comer, fumar y/o beber dentro del LCC.
5. Cada usuario deberá ser responsable de descartar los residuos que genere, siguiendo las Normas de Higiene y Seguridad de la FCEN.
6. En caso de derrame de líquidos sobre la mesada o superficie de trabajo rociar con etanol 70% y pasar toallas de papel absorbentes. Obrar de igual manera con la platina del microscopio.
7. Mantener la puerta del LCC cerrada durante el trabajo
8. Todo material de vidrio u otro (plásticos, descartables) utilizado en el cuarto deberá ser retirado por el usuario.
9. El guardapolvo utilizado en el cuarto de cultivo deberá ser de uso exclusivo para las tareas dentro del LCC.

d. De los materiales

1. El material presente en el LCC deberá estar rotulado y ser preservado y/o repuesto siempre por los usuarios del LCC.
2. No se permite almacenar mobiliario, materiales ajenos al trabajo del LCC, equipos varios (herramientas, cajas, frascos en desuso, etc), ni animales o plantas vivos o muertos.
3. No ingresará material, equipos ni mobiliario sin previa consulta con el Ministro Responsable, caso contrario el material será automáticamente retirado (eliminado) del LCC, no siendo responsable de su integridad o faltante.
4. Los responsables de los equipos permanentes del LCC o utilizados durante algún experimento, se comprometen a tener conocimiento de las tareas que estén realizando simultáneamente otros usuarios en el LCC. Así mismo se responsabilizan por sus materiales y cualquier daño o acción de ellos derive.
5. Todo el material dentro del LCC deberá estar rotulado, por dentro o fuera. Deberá estar contenido en envases plásticos o de vidrio que posean tapa que asegure su sellado y evite la evaporación.
6. NO se permite dejar material descartable propio sin usar en la superficie común de trabajo. El mismo deberá ser guardado en los cajones. Tampoco se permite colocar materiales de gran tamaño que sobresalgan de los estantes del LCC.

e. Eliminación del material.

1. Eliminar el material biológico y medios de cultivo una vez finalizado el protocolo.
3. El descarte líquido se coloca en el bidón de descarte que el usuario deberá proveer y retirar al finalizar la tarea.
4. El material de desecho sólido deberá ser retirado del cuarto de cultivo por cada usuario al terminar el protocolo diario.

f. Del Ministro Responsable del LCC.

Deberá:

1. Resguardar el mantenimiento, limpieza y orden del LCC, como así también cuidar del material y equipamiento.
2. Comprobar el correcto estado y manutención de la estufa de cultivo, del tubo de gas y de los microscopios.
3. Renovar y mantener los líquidos limpiadores y rótulos.
4. Supervisar la adecuada limpieza, ventilación, iluminación del LCC. En caso que se detecten fallas dará aviso al Servicio correspondiente.
5. Dar información acerca del funcionamiento y uso del LCC, a través del mail o personalmente en el horario correspondiente.

Ministro Responsable:

Dra. Elisa Cebal (IFIBYNE-DBBE/FCEyN)

Laboratorio 22 (interno 322).

e-mail: ecebral@hotmail.com