

CATÁLOGO LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares de VIRCELL están disponibles en presentaciones listas para uso (Shell Vials y Tubos) y en otras presentaciones para preparar tubos y placas (Frascos y Suspensiones).



Shell Vials	Tubos	Suspensiones	Frascos
No.: 24 uds	No.: 24 uds	Vol.: 30 ml (10 ⁶ células/ml)	75 o 150 cm ²
Dim.: 16 x 50 mm	Dim.: 16 x 120 mm		
Vol.: 6 ml	Vol.: 10 ml		

ORIGEN DE LAS CÉLULAS

Nuestras líneas celulares son crecidas y congeladas en nitrógeno líquido, tras un riguroso proceso de pruebas de contaminación por mycoplasma, hongos y bacterias, siguiendo los procedimientos abajo indicados.

Cada seis meses se renuevan todos los cultivos celulares desde el almacén de nitrógeno líquido. En el caso de líneas semicontinuas, se renuevan cuando se alcanzan pases subóptimos de cultivo.



CONTROLES DE CALIDAD CELULAR

Control de mycoplasma

Cada lote celular y subcultivo es sometido a controles para detección de contaminación por mycoplasma, realizándose tinción de Hoechst y PCR específica de mycoplasma. Cualquier lote o subcultivo en el que se detecte presencia de mycoplasma es desechado.

Control de contaminación bacteriana o fúngica

Muestras de cada lote de producción se inoculan en medios de enriquecimiento e incuban a 2 temperaturas (temperatura ambiente y 34-38°C). Los controles se monitorizan durante una semana tras el envío. Cualquier lote en el que se detecte contaminación será rechazado.

Control de viabilidad celular

Cada lote celular y subcultivo es sometido a examen microscópico para garantizar la ausencia de efecto citopático viral y la presencia de adecuada morfología celular. Independientemente de los controles anteriormente indicados, cada frasco, shell vial o tubo es examinado detenidamente para detectar contaminación y observar la morfología celular, en el mismo día de su envío.

NOTA: En el caso de haberse remitido a un cliente un lote celular que no cumpla con los requisitos exigidos para cada uno de los controles anteriormente citados, el cliente es avisado de la anomalía y los correspondientes cultivos son repuestos sin cargo.



PROCOLOS DE TRABAJO

Células en suspensión

- A la recepción de las células, homogeneizar la suspensión celular realizando varios pases mediante pipeta Pasteur o pipeta serológica estéril, provistas de algodón en la parte superior para evitar contaminaciones.
- Mezclar 100 μ l de la suspensión celular con 20 μ l de una solución de azul tripán al 0,1%. Hacer recuento en cámara de Neubauer excluyendo las células no viables teñidas de azul. La cantidad de medio de crecimiento que debe añadirse viene dada por la siguiente fórmula: $[(\text{No. de células contadas en una de las cuadrículas de las esquinas} \times \text{Volumen de suspensión} \times 12000) / \text{Concentración celular final (usualmente } 75\text{-}100 \times 10^3 \text{ células/ml para MRC-5)}] - \text{volumen de suspensión.}$

Ejemplo: Si en el frasco de suspensión celular tenemos 30 ml y contamos en cámara de Neubauer 115 células y 5 células teñidas de azul deberemos de multiplicar $110 \times 12.000 \times 30 \text{ ml} = 39.600.000$ que sería la concentración celular del frasco. Si deseamos ajustar la suspensión celular a 100.000 células/ml habrá que dividir $39.600.000$ entre 100.000 que nos da 396 cantidad final de medio que debemos tener, por lo que habrá que añadir 366 ml ($396 - 30$) de medio de crecimiento.

- Dispensar los shell vial a razón de 1 ml y los tubos de cultivo celular a razón de 2 ml.

Células en frascos

- Retirar el medio al frasco que se va tripsinizar decantándolo en un recipiente.
- Realizar tres lavados con PBS pH 7,5 calentado a 37°C en baño y estéril, añadiendo unos 5 ó 10 ml de PBS al frasco y decantándolo en un recipiente.
- Añadir 5-6 ml de la mezcla estéril tripsina al 0,12% -EDTA 1/4000 calentada en baño a 37°C cuidando que cubra totalmente la monocapa.
- Esperar unos segundos y examinar la monocapa a la luz. Cuando se aprecie que la monocapa comienza a volverse opaca y que empiezan a desprenderse células, retirar completamente la tripsina decantándola en un recipiente. Se puede igualmente examinar la monocapa con microscopio invertido y cuando se vea que las células comienzan a desprenderse retirar la tripsina.
- Golpear el frasco varias veces hasta que se observe que toda la monocapa se desprende.
- Añadir 10 ó 15 ml de medio de crecimiento estéril y calentado en baño a 37°C
- Homogeneizar la suspensión celular realizando varios pases mediante pipeta Pasteur o pipeta serológica estéril, provistas de algodón en la parte superior para evitar contaminaciones.
- Añadir medio de crecimiento en cantidad suficiente para repartir en el número de frascos que se vayan a realizar. Si se desea ajustar la suspensión celular a una concentración determinada ver el apartado anterior.

Células en shell vials y tubos

Examine las células cuando las reciba, prestando especial atención a la temperatura, confluencia de la monocapa, la presencia de contaminantes, el pH y la calidad de la monocapa.

Los medios contienen rojo fenol y un color rojo asalmonado indica un pH entre 7,2 y 8,9 que es el óptimo para el mantenimiento del cultivo; un color amarillo indica un pH ácido y puede suponer contaminación o sobrecrecimiento de las células; un color rosa intenso indica pH alcalino probablemente debido a pérdida de CO₂ del tubo porque presenta alguna fisura o porque está destapado. El medio de mantenimiento de los tubos contiene antibióticos para evitar la contaminación fúngica o bacteriana. Si las células llegan despegadas o en mal estado o los tubos presentan turbidez no dude en avisarnos en las primeras 48 horas de la entrega y éstas les serán reemplazadas en el plazo más breve posible.

Los shell vials se colocarán en una gradilla normal de laboratorio, y los tubos en una gradilla con 5° de ángulo de inclinación. Mantener los shell vials y los tubos a 37°C hasta su inoculación. Las células serán incubadas 24 horas a 37°C antes de su utilización. Para obtener unos resultados idóneos en sensibilidad y especificidad, es necesario emplear todos los pasos del procedimiento, así como utilizar los reactivos de tinción adecuados. VIRCELL no se responsabiliza de la inadecuada utilización de sus líneas celulares.

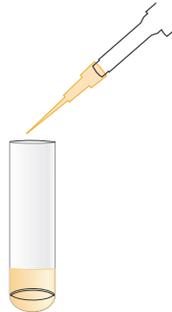
RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

Técnica de cultivo tradicional

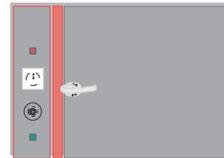
1. Incubar los viales a 37°C hasta el momento de su utilización.
2. Retirar todo el medio.
3. Añadir 100-200 μ l de inóculo por cada tubo que se inocule.
4. Incubar a 37°C durante 1 hora.
5. Tirar el inóculo y añadir 2 ml de MEM con 2% de SFB. Incubar a 37°C, examinando periódicamente.
6. En el caso de aparición de CPE o tras 7 días de incubación, romper la monocapa con una pipeta Pasteur y recoger células con el medio de cultivo. Centrifugar y del sedimento preparar extensiones.
7. Fijar con metanol o acetona y teñir con anticuerpo unido a fluoresceína.
8. Lavar con PBS. Secar y añadir una gota de glicerina tamponada.
9. Observar al microscopio de fluorescencia.



1. Retirar todo el medio



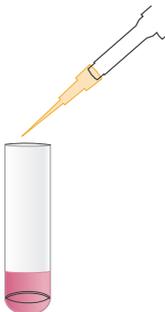
2. Inocular 200 μ l de la muestra



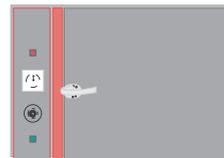
3. Incubar a 37° C durante 1 h



4. Retirar el inóculo



5. Añadir 2 ml de medio



6. Incubar a 37° C

Técnica de Shell vial

1. Incubar los viales a 34-38°C hasta el momento de su utilización.
2. Retirar el medio e inocular 200 µl de la muestra.
3. Centrifugar los tubos a 700 g durante 45 minutos.
4. Incubar a 34-38°C durante 1 hora.
5. Eliminar el inóculo y añadir 1 ml de MEM con un 2% de FBS.
6. Incubar durante 24-48 h a 34-38°C.
7. Tirar el medio y fijar durante 10 minutos con metanol. En caso de usar acetona, enfriar previamente la acetona a temperatura de -20°C o inferior y llevar a cabo la fijación durante 10 minutos también a esta temperatura.
8. Extraer el cubreobjetos pinchando el fondo del vial con una aguja al rojo vivo. Coger el cubreobjetos con pinzas (cuidando no dañar la monocapa) y secar al aire.
9. Pegar a un portaobjetos con DPX con la monocapa celular mirando hacia arriba (la cara que contiene las células aparece opaca a la luz). Presionar suavemente el cubreobjetos contra el portaobjetos con la ayuda de una punta de pipeta para evitar las burbujas.
10. Realizar la tinción siguiendo las instrucciones del kit usado para el paso de detección.

Técnica para cultivo de Chlamydia

1. Retirar el medio de cultivo.
2. Inocular 200 µl de la muestra a investigar (exudado uretral, cervical, conjuntival, etc).
3. Centrifugar los tubos a 1500 g durante 60 minutos.
4. Mantener a 37°C durante 1 hora.
5. Retirar el inóculo y añadir 1 ml de medio de crecimiento de Chlamydia.
6. Incubar 48 horas a 37°C.
7. Tirar el medio y fijar durante 10 minutos con metanol.
8. Extraer el cubreobjetos.
9. Pegar con DPX en un portaobjetos.
10. Añadir 25 µl de anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína y teñir durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
11. Lavar con PBS durante 5 minutos.
12. Secar y añadir una gota de glicerina tamponada y observar al microscopio de fluorescencia a 400x.

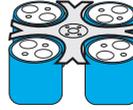
Inoculación de shell vials



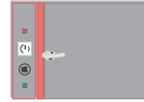
1. Retirar todo el medio



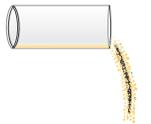
2. Inocular 200 μ l de la muestra



3. Centrifugar a 700g durante 45 min



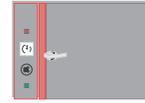
4. Incubar a 37°C, 1 h



5. Retirar el inóculo

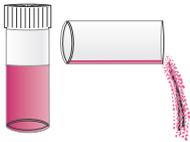


6. Añadir 1 ml de medio



7. Incubar a 37°C, 24 - 48 h

Tinción de shell vials



1. Retirar todo el medio



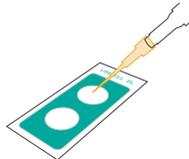
2. Fijar con metanol durante 10 min



3. Extraer el cubreobjetos



4. Adherir el cubre-objetos con DPX



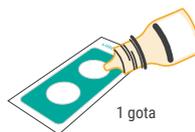
5. Añadir el anticuerpo monoclonal



6. Incubar a 37°C 30 min



7. Lavar 10 min en PBS



8. Añadir glicerina



9. Observar con microscopio de fluorescencia



CATÁLOGO DE LÍNEAS CELULARES

Línea celular	Shell Vials	Tubos	Frascos	Suspensiones
A-549	VSA5	VTA5	FTA5	SA5
B95-8			FTB95	
BGM	VSBG		FTBG	
BHK 21			FTBH	
HEp-2	VSHE	VTHE	FTHE	
L-929 (mouse)			FTL9	
LLC-MK2	VSLL	VTLL	FTLL	
McCoy	VSMC		FTMC	
MDCK	VSMD	VTMD	FTMD	SMD
MDCK-SIAT1			FTMS	
MRC-5	VSMR	VTMR	FTMR	SMR
RD	VSRD	VTRD	FTRD	
Vero	VSVE	VTVE	FTVE	SVE
Vero E6	VSV6	VTV6	FTV6	

Para otras líneas celulares, por favor consulte con nuestro Departamento de Ventas (info@vircell.com)



Vircell S.L.

Parque Tec. de la Salud,
Avicena 8
18016 Granada, España.

Tel. 958 441 264
info@vircell.com
www.vircell.com

Vircell Spain S.L.U.

Delegación Barcelona:
Pallars 99 - Of. 23
08018. Tel. 933 099 530

Delegación Madrid:
Capitán Haya 1 - Planta 16
28020. Tel. 913 457 903

info.spain@vircell.com
www.vircell.com