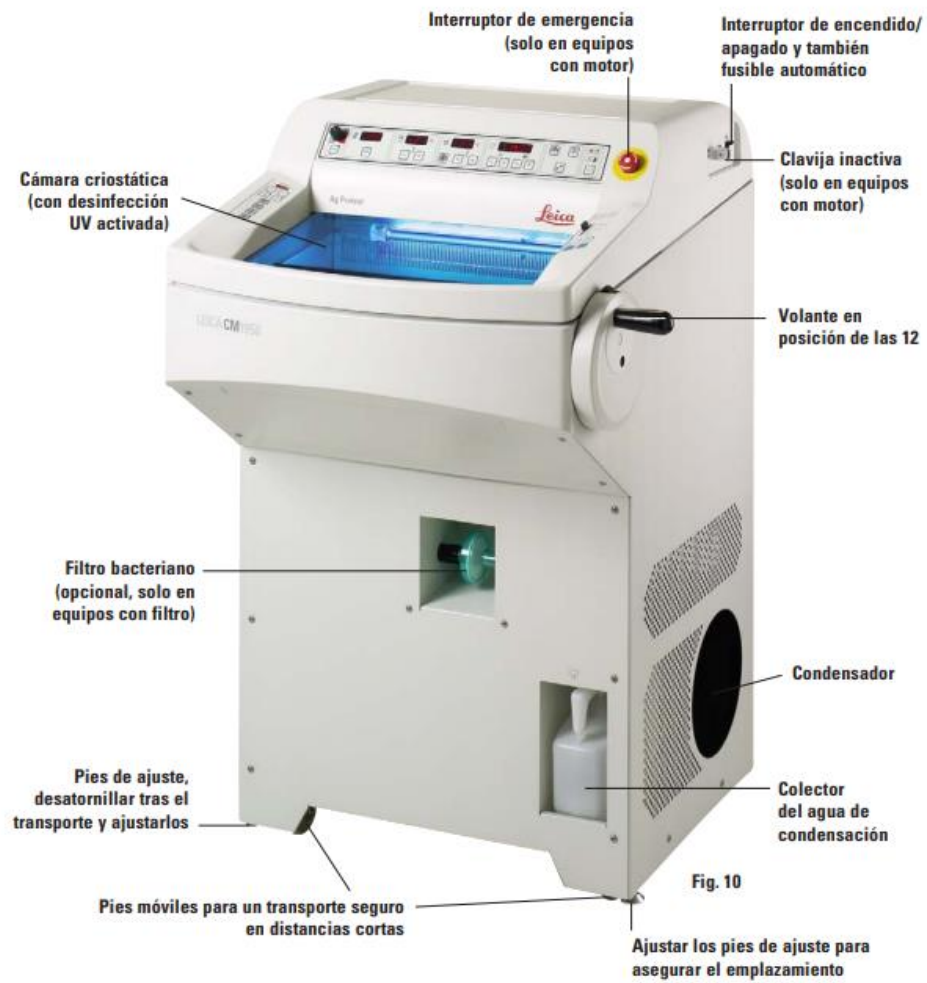


GUÍA USO DEL CRIOSTATO PARA AUTÓNOMOS

ÍNDICE

1. Vista completa del equipo -----	2
2. Paneles control y cámara criostática -----	3-4
3.A. Metodología para la realización de cortes en portaobjetos	
3.1. Equipamiento y fungibles -----	5
3.2. Preparación previa -----	5-7
3.3. Realización de los cortes y colocación en los portaobjetos -----	7-9
3.B. Metodología para la realización de cortes en flotación	
- Equipamiento y fungibles-----	10
- Preparación previa -----	10-11
- Realización de cortes seriados en eppendorf-----	11-12
4. Finalización del trabajo -----	13
5. Medidas preventivas -----	13
6. Limpieza y mantenimiento -----	14
7. Reserva del equipo y registro -----	14-15

1. Vista completa criostato



2. Paneles de control y cámara criostática

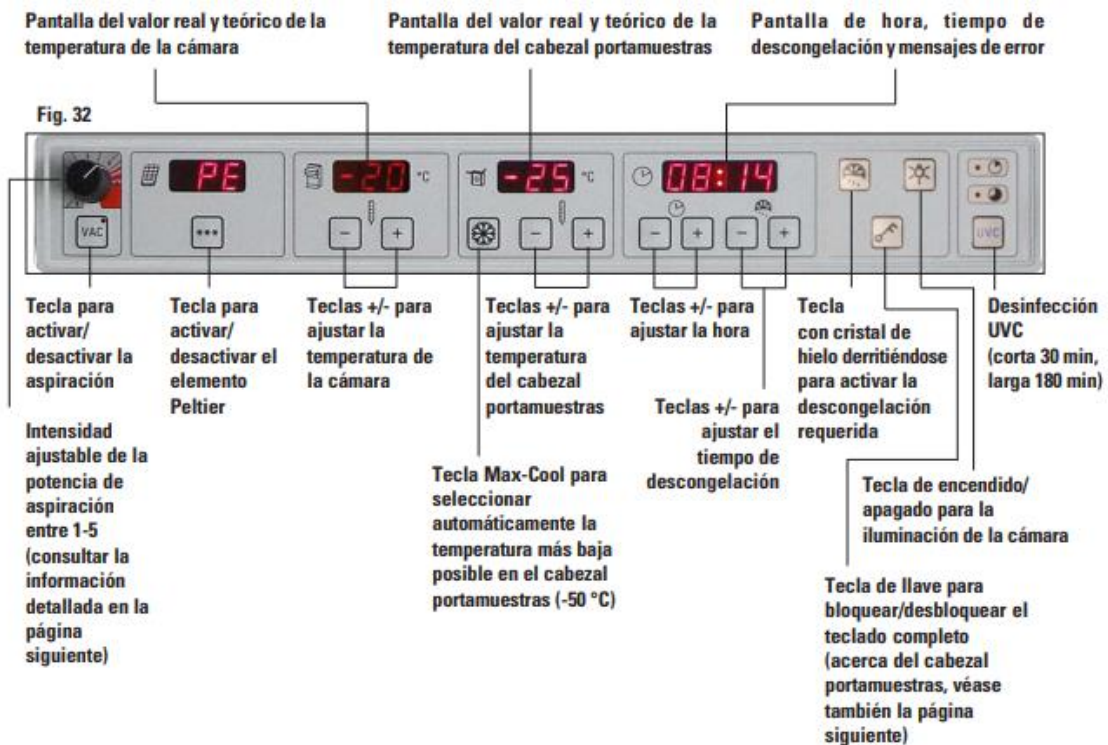
- 1 - Panel de control 1: aspiración, regulación de la temperatura y del tiempo, iluminación, desinfección UV
- 2 - Panel de control 2: avance macro eléctrico (ajuste del espesor de corte y de desbaste)
- 3 - Panel de control 3: corte motorizado, opcional (ajuste del tipo de carrera, velocidad de corte, etc.)



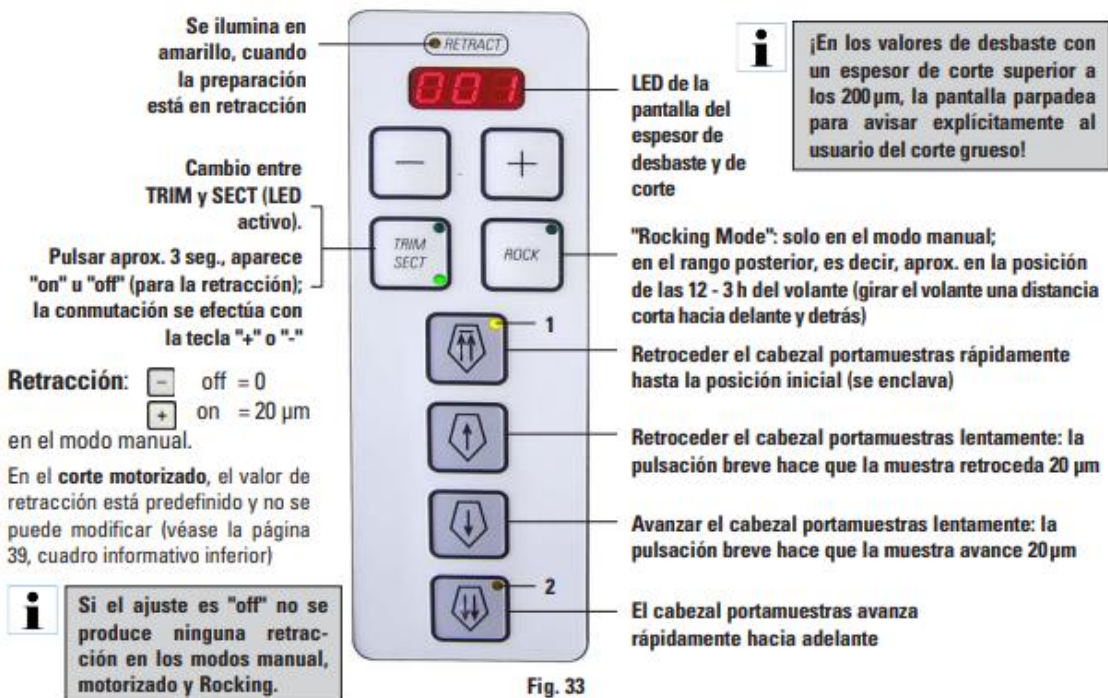
Fig. 11

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 4 - Bloque fijo de disipación térmica (opcional) 5 - Elemento Peltier (con 2 estaciones) 6 - Regleta de congelación, 15 posiciones 7 - Soporte de posicionamiento de la regleta de congelación 8 - Bloque móvil de disipación térmica y frigorífica (opc.) 9 - Bandeja desplazable (opcional) 10 - Soporte de hojas CE con dispositivo de expulsión de hojas (a) | <ol style="list-style-type: none"> 10b- Apoyo para dedos en el soporte de hojas CE 10c- Protector de dedos en el soporte de hojas CE 11 - Tobera del tubo de aspiración 12 - Tubo de aspiración de los restos de los cortes 13 - Compartimento para pinceles (opcional) 14 - Boca de empalme del tubo de aspiración (detrás se halla el elemento del filtro grueso) 15 - Cabezal portamuestras orientable 16 - Bandeja recogecortes |
|--|---|

Panel de control 1:



Panel de control 2: avance macro eléctrico, pantalla del espesor de corte y de desbaste



3.A. METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DE CORTES DE CONGELADO CON EL CRIOSTATO EN PORTAOBJETOS

3.1. Equipamiento y fungibles:

Equipamiento utilizado:

- Criostato Leica CM1950
- Ultracongelador -80°
- Microscopio (Opcional)

Fungibles (proporcionados por el usuario)

- Cuchillas microtomo perfil bajo
- Portaobjetos superfrost plus
- Portaobjetos esmerilados (opcional)
- OCT
- Cajas de preparaciones
- Pinceles
- Lápiz
- Cuchilla PAL de un filo (opcional)
- Espátula (opcional)
- Guantes de nitrilo y guantes de algodón para proteger frío (opcional).
- Bandeja para el transporte.
- Etanol 70% y papel de celulosa
- Caja de poliespán con nieve carbónica
- Muestras congeladas en OCT

3.2. Preparación previa

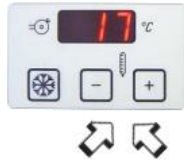
- Criostato:



- La temperatura de la cámara debe ponerse a -20°. Cuando no hay uso del equipo la temperatura se subirá a -15° (el personal de Histología la cambiará a primera hora en la revisión del equipo)

- Introducir las muestras en la cámara criostática para que se aclimaten a la temperatura de corte ya que se almacenan a -80°.
 - ❖ Asegúrate que el freno del volante está puesto, que no hay puesta una cuchilla y que está limpia la zona del portacuchillas. Si se detectará algún fallo en la seguridad o limpieza avisad y poner dejad constancia en el cuaderno de registro. Si no se hace la responsabilidad será del último usuario desde que se detecta el fallo.
- Aclimatar también los pinceles y la cuchilla. Colocar la cuchilla aflojando la palanca de sujeción hacia delante y colocando la cuchilla. Asegurar la cuchilla ajustando la palanca hacia dentro.

- Poner un papel para cubrir la zona que no está cubierta por la bandeja recogecortes.
- Encender el cabezal portamuestras y poner a la temperatura según el órgano a cortar.



La refrigeración del cabezal portamuestra se enciende pulsando la tecla de la llave y a continuación la tecla de + del panel del cabezal portamuestras.

Se ajusta la temperatura pulsando las teclas “+” y “-“



La temperatura del cabezal portamuestra por defecto es -20°, algunos órganos requieren temperaturas más altas (p.ej.cerebro se corta a -15°) y grasa a -30°



-Ajustar el espesor del desbaste pulsando la tecla TRIM/SEC. El modo TRIM está activo si el LED superior derecho está encendido.

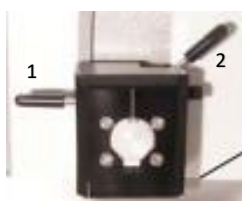
Ajustar el espesor de desbaste mediante las teclas “+” y “-“ en el panel 2.



- Ajustar el espesor de corte volviendo a pulsar la tecla TRIM/SEC. El modo SEC está activo si el Led inferior derecho está encendido. Ajustar el espesor deseado con las teclas “+” y “-“.

- Preparación de la muestra y los portaobjetos:

- Sacar las muestras del molde y darle la vuelta a la muestra ya que se pegará al portamuestra la superficie superior de la muestra en el molde. Dejar en la bandeja desplazable.
- Los portamuestras están fuera de la cámara criostática a Tª ambiente. Cubrir la superficie del portamuestras con OCT y ya en la zona de la bandeja desplazable colocar la muestra. Dejar enfriar en la zona de la regleta. Comprobar que no hay restos de OCT fuera del portamuestras o por debajo ya que impedirían una correcta sujeción.
- Mientras rotular los portaobjetos con el nombre de la muestra y colocar fuera de la cámara criostática en la parte superior del criostato.
- Colocar la muestra en el cabezal del portamuestra. Comprobar bloqueo del volante y poner protector de dedos de la cuchilla.

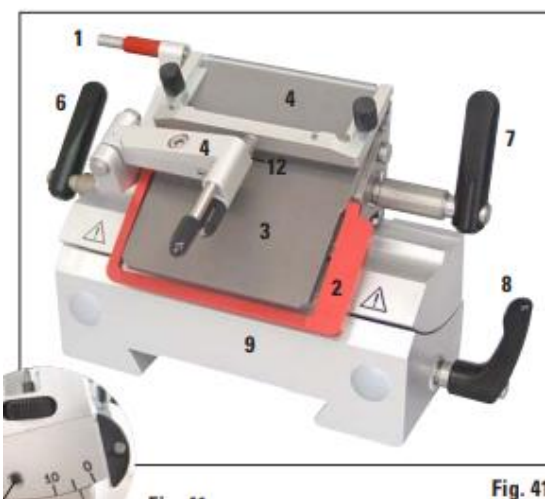


- (1) Palanca de sujeción del portamuestras
- (2) Palanca de sujeción cabezal del portamuestras

Se coloca la muestra aflojando hacia abajo la palanca de sujeción del portamuestras(1). Una vez colocada la muestra se vuelve a la posición original.

Aflojando la palanca de sujeción del cabezal portamuestras hacia la izquierda se deja libre el cabezal para poder moverse, colocando en la posición en que la zona a cortar quede paralela a la zona de la cuchilla. Una vez ajustada se vuelve la palanca a su posición original.

- Aflojar la palanca de sujeción lateral (6 fig 41) para usar la zona de la cuchilla deseada.
- Acercar el portacuchillas lo más posible a la muestra aflojando la palanca de fijación del portacuchillas a la base (8)



- Con dispositivo de expulsión de hojas (1).
- Con protector de dedos (2).
- Desplazamiento lateral integrado y base estable
- Ajuste del ángulo de penetración (5) con llave Allen SW 3 (véase la fig. detallada 5, a la izquierda del portacuchillas); el ángulo recomendado se sitúa entre 2° y 5°.
- Con enderezador de corte (4).
- Palanca (6) de desplazamiento lateral.
- Palanca (7) de fijación de la hoja.
- Palanca (8) de fijación de la base (9) en la guía de cola de milano de la cámara.
- Placa de presión (3) para la aspiración de cortes.
- Si se utilizan hojas SB, es preciso colocar la regla (7, fig.).

- Si la temperatura del cabezal portamuestra es diferente a la temperatura de la cámara dejar aclimatar la muestra.



Acercar más con el avance macro del brazo en el panel de control 2

3.3. Realización de los cortes:

Girar el volante y empezar a cortar. Comprobar que la zona de corte se corta de forma completa. Si no es así bloquear el volante y volver a orientar el cabezal portamuestras. Con el avance macro retroceder un poco.

Cada vez que con el volante subimos el brazo hay que tener la precaución que el enderezador de corte (anti-roller) esté quitado.

- Una vez que está orientada la muestra desbastar hasta llegar a la zona de interés a cortar pulsando la tecla TRIM
- Cuando se llega a la zona de interés cambiar a SEC y desechar los primeros cortes ya que no corresponden a las micras que queremos.

Desechar también los cortes cuando hemos esperado tiempo o hemos movido lateralmente la cuchilla.

- ❖ El giro del volante debe ser a una velocidad constante, no pudiendo cambiar la velocidad o parar cuando estemos cortando la zona donde está la muestra.
- Se puede estirar el corte con ayuda de un pincel o usando el anti-roller.

- **Estiramiento usando el anti-roller:**

Comprobar que el anti-roller esté bien colocado para que el corte se disponga entre el cristal y el portacuchillas. Ajustarlo con el espesor que vayamos a cortar.

Ajuste del enderezador de corte (anti-roller)



Se cambia la altura del anti-roller girando el tornillo(1)en sentido horario o antihorario.



- El corte se enrolla por encima de la placa de cristal(antiroller). La placa no tiene altura suficiente.
- Girar el tornillo (1) en sentido antihorario. Hacer giros muy pequeños y comprobar.



- El corte se enrolla y la placa choca con la muestra. Peligro con mellar la placa y dañar la muestra. La placa está demasiado alta.
- Girar el tornillo (1) en sentido horario.



El corte se sitúa entre el portacuchilla y la placa anti-roller de forma que tenemos el corte estirado. El anti-roller está bien colocado.

Con un pincel fino sujetar el corte antes de retirar la placa. En ocasiones hay que usar dos pinceles si se enrolla por la parte superior e inferior.

Una vez que tenemos el corte estirado acercamos el portaobjetos y se pegará nuestro corte. No presionar el porta sobre el corte.

- **Estiramiento usando pincel:**

Podemos estirar el corte sin usar el anti-roller.con la ayuda de pinceles finos.

Para eso con el la placa plegada bajaremos el brazo y con la mano izquierda tenemos un pincel situado en la zona inferior del bloque en una zona donde no exista muestra. Al cortar el bloque nuestro pincel quedará pegado al corte y nos permitirá estirar el corte.

- ❖ No tocar con el pincel la cuchilla y no presionar con el pincel nuestro corte sobre el portacuchillas cuando todavía no está estirado.
- Acercar el portaobjeto al corte sin presionar el corte y poner el portaobjeto fuera del criostato en la parte superior.
- Colocar los siguientes cortes si así se requieren.
- Dejar unos min fuera del criostato para que el corte se adhiere, esto es especialmente importante en tejidos grasos. Pasado ese tiempo, colocar de manera ordenada en la caja de preparaciones e introducir la caja dentro del criostato o en la caja de poliespán con la nieve carbónica.



Una vez terminado con los cortes requeridos de la muestra daremos al botón de retroceso del panel de control 2 para que el brazo vuelva a la posición de inicio.

-Retirar la muestra del cabezal portamuestra aflojando la palanca de sujeción.

-Sacar el portamuestra al exterior de la cámara crióstática y separar la muestra del portamuestra con ayuda de una espátula. No esperar mucho tiempo para que la muestra no se descongele.

- Con una cuchilla PAL de un filo recortaremos los restos de OCT de nuestra muestra y la volvemos a introducir en su molde. Reservamos dentro de la cámara hasta la finalización del trabajo.
- Es conveniente separar en cajas diferentes los bloques ya cortados de los no cortados.



- Al finalizar retirar la cuchilla aflojando la palanca de sujeción y dando al dispositivo de expulsión de hojas.

B. METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN CORTES EN FLOTACIÓN

3.1. Equipamiento y fungibles:

Equipamiento utilizado:

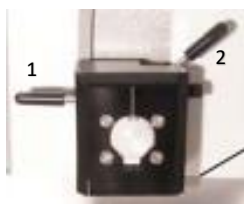
- Criostato Leica CM1950
- Ultracongelador -80°
- Microscopio (Opcional)

Fungibles (proporcionados por el usuario)

- Cuchillas microtomo perfil bajo
- Gradilla con eppendorf
- Líquido anticongelante (CBS)
- OCT
- Pinceles
- Rotulador fino
- Cuchilla PAL de un filo (opcional)
- Espátula (opcional)
- Portaobjetos esmerilados (opcional)
- Guantes de nitrilo y guantes de algodón para proteger frío (opcional).
- Bandeja para el transporte.
- Etanol 70% y papel de celulosa
- Caja de poliespán con nieve carbónica o con hielo para transportar las muestras y las gradillas con los cortes.
- Muestras congeladas en OCT

3.2. Preparación de la muestra y los eppendorf o placa multipocillo

- Sacar las muestras del molde y darle la vuelta a la muestra ya que se pegará al portamuestra la superficie superior de la muestra en el molde. Dejar en la bandeja desplazable.
- Los portamuestras están fuera de la cámara criostática a Tª ambiente. Cubrir la superficie del portamuestras con OCT y ya en la zona de la bandeja desplazable colocar la muestra. Dejar enfriar en la zona de la regleta. Comprobar que no hay restos de OCT fuera del portamuestras o por debajo ya que impedirían una correcta sujeción.
- Mientras rotular los eppendorf o la placa con el nombre de la muestra y el número de serie y rellenar con el líquido anticongelante (CBS) y colocar en la bandeja desplazable de la cámara criostática donde no nos estorbe (recomendado en el extremo derecho)
- Colocar la muestra en el cabezal del portamuestra. Comprobar bloqueo del volante y poner protector de dedos de la cuchilla.

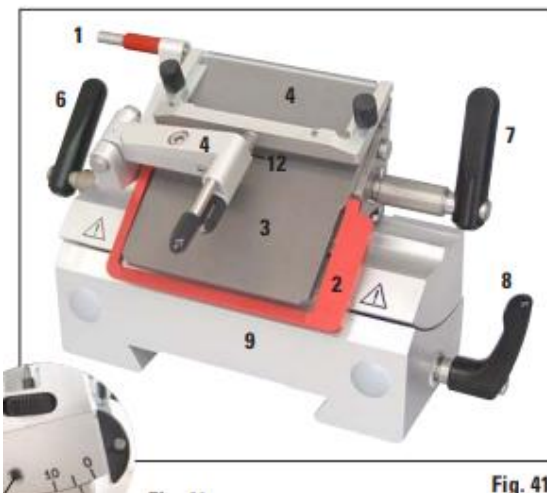


- (3) Palanca de sujeción del portamuestras
- (4) Palanca de sujeción cabezal del portamuestras

Se coloca la muestra aflojando hacia abajo la palanca de sujeción del portamuestras (1). Una vez colocada la muestra se vuelve a la posición original.

Aflojando la palanca de sujeción del cabezal portamuestras hacia la izquierda se deja libre el cabezal para poder moverse, colocando en la posición en que la zona a cortar quede paralela a la zona de la cuchilla. Una vez ajustada se vuelve la palanca a su posición original.

- Aflojar la palanca de sujeción lateral (6 fig 41) para usar la zona de la cuchilla deseada.
- Acercar el portacuchillas lo más posible a la muestra aflojando la palanca de fijación del portacuchillas a la base (8)



- Con dispositivo de expulsión de hojas (1).
- Con protector de dedos (2).
- Desplazamiento lateral integrado y base estable
- Ajuste del ángulo de penetración (5) con llave Allen SW 3 (véase la fig. detallada 5, a la izquierda del portacuchillas); el ángulo recomendado se sitúa entre 2° y 5°.
- Con enderezador de corte (4).
- Palanca (6) de desplazamiento lateral.
- Palanca (7) de fijación de la hoja.
- Palanca (8) de fijación de la base (9) en la guía de cola de milano de la cámara.
- Placa de presión (3) para la aspiración de cortes.
- Si se utilizan hojas SB, es preciso colocar la regla (7, fig.).

- Si la temperatura del cabezal portamuestra es diferente a la temperatura de la cámara dejar aclimatar la muestra.



Acercar más con el avance macro del brazo en el panel de control 2

3.3. Realización de los cortes seriados en eppendorf:

Girar el volante y empezar a cortar. Comprobar que la zona de corte se corta de forma completa. Si no es así bloquear el volante y volver a orientar el cabezal portamuestras. Con el avance macro retroceder un poco.

- Con la mano izquierda colocamos el pincel en el extremo inferior izquierdo del bloque (donde no hay muestra) y cuando realizamos el corte éste quedará enrollado en el pincel.
- Depositamos el corte en eppendorf 1 de la serie procurando no tocar ni el líquido ni las paredes del tubo.
- Volveremos a cortar y lo colocaremos en el segundo tubo. Al acabar la serie con el número de tubos indicados por el usuario, volveremos a colocar el nuevo corte en el primer tubo.



Una vez terminado con los cortes requeridos de la muestra daremos al botón de retroceso del panel de control 2 para que el brazo vuelva a la posición de inicio.

Retirar la muestra del cabezal portamuestra aflojando la palanca de sujeción.

Sacar el portamuestra al exterior de la cámara criostática y separar la muestra del portamuestra con ayuda de una espátula. No esperar mucho tiempo para que la muestra no se descongele.

- Con una cuchilla PAL de un filo recortaremos los restos de OCT de nuestra muestra y la volvemos a introducir en su molde. Reservamos dentro de la cámara hasta la finalización del trabajo.



- Al finalizar retirar la cuchilla aflojando la palanca de sujeción y dando al dispositivo de expulsión de hojas.

- Las muestras se conservan a -80° y los eppendorf con los cortes se conservan el congelador a -20° hasta su entrega al usuario.
 - En lugar de eppendorf se puede cortar en placas multipocillo usando una fila por cada muestra.

4.FINALIZACIÓN DEL TRABAJO

- Asegúrate de quitar la cuchilla
- Si se ha quitado la placa anti-roller, volver a colocarla en su sitio y sustituirla por la de uso común.
- Dejar el brazo echado hacia atrás hasta el tope y BLOQUEADO.
- Limpiar con ETANOL 70% (nunca con agua) los restos que hayan podido quedar en las bandejas o dentro de la cámara.
- Asegurarse que todas las manivelas de sujeción están apretadas
- Colocar los discos portamuestras en su sitio y limpiar los restos con etanol. Asegúrate que hay 2.
- Dejar cerrada la puerta de vidrio de la cámara del criostato
- Si se ha cambiado la temperatura volver a poner la que te encontraste.
- Apagar la luz de la cámara.
- Rellena el cuaderno de registro del criostato, indicando la fecha y hora de entrada y de salida.



- Desconecta la refrigeración del portamuestras(llave y -)

NOTA: Si mantienes pulsada la tecla "Llave" durante más de 5 segundos se bloqueará el equipo. La señal que está bloqueado es que desaparecen los ":" en medio de los datos de hora/min en el panel del reloj. Para desbloquear se vuelve a mantener apretada la tecla " Llave" durante 5 segundos hasta que vuelven a aparecer los ":" : "en el panel del reloj.

- No apagar la refrigeración de la cámara.
- No dejar material sobre las poyatas.
- No apagar el nunca el aire acondicionado ni variar la temperatura.
- Cerrar la sala donde está el criostato con llave.

6.MEDIDAS PREVENTIVAS

- El personal técnico se le recomienda utilizar guantes de nitrilo como EPI para la protección de las manos.
- Como protección del frío se podrá utilizar guantes de algodón debajo de los guantes de nitrilo.
 - Para evitar cortes se seguirán las recomendaciones de seguridad para la utilización este equipo (bloqueo del equipo, utilización de protector de dedos)

7.LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO DE LOS EQUIPOS

- La limpieza de los equipos se hará diariamente después de su uso.
- Se limpian con etanol de 70% y trapicel o bobina de celulosa. Nos ayudaremos de pinceles.
- Aflojaremos la palanca de sujeción del portacuchillas y sacaremos el portacuchillas colocándolo dentro de la cámara en la parte de la derecha de la regleta. Limpiaremos la parte de detrás del portacuchillas.
- Retiraremos el papel y la bandeja recogecortes y tiraremos los cortes en una papelera. Limpiaremos la bandeja con etanol y los restos de cortes de la cámara.
- Volvemos a colocar la bandeja y el portacuchillas y limpiamos el portacuchillas por la parte superior y lateral.
- En ocasiones debemos limpiar también la zona donde se introduce la cuchilla por lo que habrá que desmontar el portacuchillas (realizado sólo por personal de Histología)
- Limpiar también con etanol los restos de OCT de la regleta, de la bandeja desplazable y los portamuestras.
- Limpiar con etanol el volante y los botones exteriores del criostato.
- Si se detecta un mal funcionamiento del equipo, avisad al servicio de Histología detallando lo más posible el fallo.

8.RESERVA DEL EQUIPO Y REGISTRO:

- Los usuarios pueden utilizar el criostato de forma autónoma si son autorizados después de recibir la formación por parte del personal de Histología o de firmar que se le ha dado la formación para la utilización del equipo por otros medios.
- Los usuarios autónomos deben aparecer en la lista de registro de usuarios autónomos del criostato (FOR HIS-11). Además de conocer el funcionamiento del equipo deben conocer las normas de utilización del equipo y limpieza dispuestas por este Servicio de Histología. Estas normas son explicadas por el personal de Histología, además están publicadas en la web del Servicio y están visibles en hojas en la pared de la sala donde está el criostato.
- Si se detectará un incumplimiento reiterado de las normas de funcionamiento o limpieza del equipo se podrá retirar la autorización de usos como autónomo.
- Los que han recibido la formación por parte de Histología deben haber sido autorizados como usuarios autónomos según el modelo de autorización (FOR-HIS-09) y rellenado la encuesta de curso de criostato según el modelo (FOR- HIS-10)

- El criostato debe reservarse en la intranet antes de su uso. Se reserva en la web www.iib.uam.es/intranet/ reserva recursos/ Categoría: Aparatos, Recursos: Criostato CM1950
- Deben anotarse en el cuaderno de registro del criostato (FOR-HIS-01)