

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 1 de 34

Servicio de Cultivos Celulares

Normas de funcionamiento

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 2 de 34

Contenido

1. OBJETIVO:.....	3
2. ÁMBITO DE APLICACIÓN:	3
3. PERSONAL AUTORIZADO.....	3
3.1. Datos de los responsables:	3
4. INTRODUCCIÓN.....	4
4.1 ¿Qué es el cultivo celular?	4
4.2. Servicio de Cultivos Celulares de Biomedicina, Lleida.....	4
5. DESCRIPCIÓN DE CULTIVO CELULAR, RIESGOS Y LABORATORIOS:	5
6. NORMAS BÁSICAS DE LAS SALAS DE CULTIVOS CELULARES.....	8
SOLUCIONES DESINFECTANTES DE LAS SALAS DE CULTIVOS:	9
7. APARATOS DEL SERVICIO: INSTRUCCIONES DE USO.	10
7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:	11
7.1.1. PNT CABINA FLUJO LAMINAR.....	13
7.1.2. PNT CABINA BIOSEGURIDAD II (BIOIIA).....	15
7.2. INCUBADORAS DE CO ₂ :.....	17
7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS	18
7.5. BAÑOS:	21
7.6. TANQUE DE N ₂ LÍQUIDO (-196°C) (<i>más información en el PNT-CC-18</i>):	22
7.7. CAMARA DE HIPOXIA.....	23
8. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS	24
9. INSTRUCCIONES EN CASO DE CONTAMINACIÓN:	25
10. CONTROL DE MICOPLASMA:.....	26
11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERIAS E INCIDENCIAS:.....	27
12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:.....	28
13. TRANSPORTE DE MUESTRAS DE RIESGO BIOLÓGICO	29
13.1 Ejemplo de cómo transportar lentivirus correctamente:.....	31
14. SANCIONES Y AMONESTACIONES	32
15. CITACIÓN EN LAS PUBLICACIONES	32
16. TARIFAS	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO 1. Tareas de mantenimiento de los aparells y de los laboratorios	34

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 3 de 34

1. OBJETIVO:

Asegurar que todo el personal que indirecta o directamente trabaje con experimentos donde se utilizan cultivos celulares de mamíferos *wild type* o transformados de forma estable o temporal (OMG), reciban instrucciones adecuadas.

Estas instrucciones incluirán como mínimo, entrenamiento en técnicas de trabajo en asepsia y en la bioseguridad de los organismos que se usan en los experimentos, permitiendo entender y asumir los riesgos biológicos que pueden comportar.

El objetivo de estas directrices son guiar al personal con las instrucciones mencionadas, así como saber a quién pedir consejo y/o ayuda en caso de necesidad. Dar a conocer la estructura y características de los laboratorios del SCT-CC, las normas básicas de trabajo y de uso de los aparatos, así como las personas responsables a quién dirigirse en caso de averías, contaminaciones, accidentes o sugerencias.

Las instalaciones del Servicio de Cultivos de la UdL-IRBLleida están acreditadas para el trabajo con OMG de tipo II y por tanto, cumplen con los requisitos de los laboratorios de contención biológica de nivel 2 (NCB-2) con las consecuentes características propias de este nivel, características descritas en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf y comprometiéndose en el cumplimiento de normas y protocolos para los usuarios de los servicios.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN:

Estas directrices se aplican a los usuarios de los Laboratorios de Cultivos Celulares de la UdL-IRBLleida.

3. PERSONAL AUTORIZADO

En los laboratorios de cultivos celulares sólo puede entrar el **personal autorizado**.

Cada usuario tendrá un investigador responsable que se hará cargo de sus experimentos y del cumplimiento de la normativa y buena praxis dentro del servicio. La/El IP completará una ficha de grupo (P-CC-28) donde mencionará los miembros de su grupo que usarán el servicio, con qué células trabajará y el nivel de bioseguridad que requieren, y en qué proyecto está vinculado para poder hacer la facturación. El primer día de entrar al servicio, los nuevos usuarios llenarán una ficha con sus datos personales (P-CC-18) y recibirán una explicación de las directrices del servicio. Así mismo los nuevos usuarios tendrán que acreditar haber entendido y aceptado el reglamento a través de un pequeño examen. El servicio se reserva el derecho de admisión a las instalaciones en caso de no cumplir con la normativa establecida en ellas.

3.1. Datos de los responsables:

	Nom	Localització	e-mail	Ext. Tel.
Coordinadora científica	Judit Ribas	Lab. B2.2	judit.ribas@mex.udl.cat	2936
Responsable Técnico	Marta Rafel	despacho 2.4 Bio. II	mrafel@irbllleida.cat	2953 12953
Técnico superior de apoyo	Iván Hidalgo	despacho 2.4 Bio. II	ihidalgo@irbllleida.cat	2953 12953

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 4 de 34

4. INTRODUCCIÓN

4.1. ¿Qué es el cultivo celular?

El cultivo celular de mamíferos es el proceso o conjunto de técnicas que permiten el crecimiento de fragmentos tisulares de diferentes especies en un ambiente artificial "in vitro", para examinar y manipular el comportamiento celular manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, metabólicas, bioquímicas, genéticas, etc. En los laboratorios de cultivos celulares se trabaja con el cultivo de células que pueden venir de líneas celulares inmortalizadas o de cultivos primarios.

La característica principal, que define el laboratorio de cultivos celulares, es el **mantenimiento de la asepsia** puesto que la tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior a la de los microorganismos contaminantes habituales (hongos, levaduras, bacterias y virus). Por lo tanto, por el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición de cualquier microorganismo no deseado.

4.2. Servicio de Cultivos Celulares de Biomedicina, Lleida

El Servicio de Cultivos (SCT-CC) se encarga de velar por el buen funcionamiento de los diferentes espacios y equipamientos destinados al trabajo con cultivos celulares, así como formar a sus usuarios en buenas prácticas, preservación de la asepsia y la **bioseguridad**, asesorarlos en caso de necesidad tanto en cuestiones técnicas como en el diseño de algunos experimentos.

Es un servicio adscrito al Departamento de Ciencias Médicas Básicas (CMB) de la UdL y pueden ser usuarios todos los investigadores de los diferentes departamentos de la Universitat de Lleida y del IRBLleida así como también investigadores externos, los cuales podrán cultivar y manipular todo tipos de células de mamíferos (tanto células primarias como líneas celulares estables) que tengan un nivel de contención Biológica 2 (NCB-2) o inferior, permitiendo estudiar y caracterizarlas a nivel molecular y celular. Los usuarios pueden trabajar a modo de autoservicio o con el apoyo de los técnicos del servicio. El servicio también ofrece la posibilidad de utilizar una sala con NCB-2 para manipular/cultivar muestras humanas. El servicio no acepta y no tiene las instalaciones necesarias para cultivar o aislar agentes biológicos peligrosos de riesgo 3 los cuales requieren un nivel de contención 3 o superior, tal como pasa con el virus SARS-CoV-2.

En caso de necesitar manipular muestras humanas y/o agentes biológicos de riesgo 2 habrá que estar previamente autorizados por el comité de Bioseguridad (comitebioseguretat@irblleida.cat).

Antes de trabajar con cualquier cultivo se tiene que comprobar los requerimientos de Bioseguridad del cultivo (en caso de duda podéis consultar páginas oficiales como la ATCC o en el web: insst.es/databio-fichas-de-agentes-biológicos donde especifica el nivel de bioseguridad necesario para el trabajo con dichas células).

El SCT-CC se encuentra ubicado en el **edificio de Biomedicina en el IRBLleida** y cuenta con 6 salas con nivel de contención 2 con características específicas para uso de cultivos celulares, una sala de disección y una zona de crioconservación celular con tanques de Nitrógeno líquido.

- Lab -1.3:** Laboratorio para trabajar con Líneas estables.
- Lab 1.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire independiente con entrada de aire filtrado con HEPA para el trabajo con Líneas estables.
- Lab 2.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire con entrada de aire filtrado con HEPA para el trabajo con cultivos primarios.
- Lab 2.16:** Laboratorio de cultivos con presión positiva, doble puerta circulación de aire independiente con entrada y salida de aire filtrado con HEPA para cultivos delicados (stem cells), de larga duración y libres de micoplasma y virus.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 5 de 34

5. **Lab 3.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire con entrada de aire filtrado con HEPA para el trabajo con cultivos primarios.
6. **Lab 3.16:** Laboratorio de cultivos con presión negativa, doble puerta circulación de aire independiente con entrada y salida de aire filtrado con HEPA para manipular o cultivar cultivos de muestras humanas de NCB-2 y/o producción de lentivirus.
7. **Lab 4.11:** Laboratorio de disección.

EQUIPAMIENTO DEL SERVICIO:

El SCT-CC cuenta con:

16 INCUBADORAS DE CO ₂	17 CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR	6 CAMPANAS DE BIOSEGURIDAD IIA	2 CENTRIFUGAS refrigeradas (1 con tapa ANTIAEROSOL)	4 CENTRIFUGAS RT
10 BAÑOS TERMOSTÁTICOS	1 CABINA DE HIPOXIA	1 LUPA DE FLUORESCENCIA	5 LUPAS DE DISECCIÓN	6 MICROSCOPIOS INVERTIDOS FLUORESCENCIA CON CÁMARA
4 MICROSCOPIOS INVERTIDOS	5 VÓRTEX			

El laboratorio 3.16 presenta unas directrices y normas específicas (DOC-CC-04). Los usuarios deben tener una autorización específica antes de poder tener acceso. Contactar con el personal del servicio para más información.

5. DESCRIPCIÓN DE CULTIVO CELULAR, RIESGOS Y LABORATORIOS:

5.1. Definición Cultivos Primarios y Cultivos de Líneas

El Cultivo de células implica una disgregación celular, ya sea por métodos enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular que se obtiene se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. El cultivo de células permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones.

Las células que se cultivan directamente desde un sujeto se conocen como células primarias. La mayor parte de los cultivos celulares primarios tienen un período de vida limitado, es decir, al cabo de cierto número de divisiones las células entran en senescencia y dejan de dividirse, generalmente manteniendo la viabilidad. Ocasionalmente, un cultivo primario se mantiene durando más generaciones de las esperadas. Este hecho es debido a la aparición de células inmortales al cultivo. La razón de la inmortalización de estas células es, en la mayor parte de las veces, desconocida, pero se cree que esta capacidad está relacionada con las vías de control celular, es decir que para que un cultivo primario se establezca como línea estable está directamente relacionado con su variabilidad genética.

Una línea celular establecida o inmortal es la que ha adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente

En el SCT-CC hay diferenciados laboratorios por cultivos primarios y por cultivos de líneas:

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 6 de 34

Laboratorios de Primarios: Destinados al trabajo con cultivos de células primarias y células de líneas contaminadas con micoplasma o no testadas.

Laboratorios de Líneas: Destinados al trabajo con líneas celulares estables libres de micoplasma.

Todos los laboratorios de cultivos del SCT-CC están acreditados como salas de contención de nivel 2, el cual exige entre otros:

- Salas independientes del resto del edificio
- Sistema de ventilación independiente y con filtración HEPA
- Usuarios formados para manipular agentes biológicos
- Acceso restringido a las instalaciones
- Uso de cabinas de bioseguridad para manipulación y/o cultivo de agentes biológicos con requerimiento NCB2 especialmente muestras y cultivos humanos
- Minimización de la producción de aerosoles y salpicaduras, y siempre dentro de la cabina de bioseguridad o con el uso de centrifugas con tapas antiaerosoles.

5.2. Principales riesgos biológicos de los cultivos:

Los cultivos celulares de mamíferos no contaminados con otros agentes biológicos, generalmente no presentan un riesgo significativo para el manipulador, la posible inoculación dérmica de este cultivo origina solo una inflamación local. De todos modos, estos cultivos pueden contribuir sustancialmente al riesgo del manipulador a la exposición a otros agentes biológicos que pueden actuar como base o ayudar a la supervivencia o en la replicación de agentes oportunistas.

Los cultivos de células humanas y de primates pueden contener virus patógenos entre los cuales: Virus de la Hepatitis B y C, VIH, virus de las leucemias humanas, Virus Epstein-Barr, citomegalovirus, Herpes simplex 1 y 2, SARS-CoV-2... Los cultivos de células animales no humanos o de primates pueden contener Virus *Hanta, corion meningitis linfocítica, virus de la influenza, etc. Así como otros parásitos como la toxoplasmosis o el mycobacterium tuberculosis que podría estar presente en tejidos pulmonares humanos, etc.

Otras células y tejidos de primates también presentan riesgos para el personal de laboratorio. Los peligros potenciales se presentan por células transformadas con agentes virales como el SV-40, EBV o HBV, así como también células que contienen material genómico viral. Las células carcinogénicas también resultan potencialmente peligrosas como resultado de la auto-inoculación.

Los cultivos celulares de mayor riesgo son los que proceden de humanos y primates, especialmente si derivan de sangre periférica, tejido linfático y nervioso.

(Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares. NTP 902. 2011)

Algunas líneas humanas y de primates presentan un riesgo especial y se clasifican en el grupo de riesgo Biológico superior a 1. Por lo que es muy importante evaluar el riesgo biológico de cada una mirando las especificaciones de bioseguridad en que ha sido clasificada cada línea celular y sus procedimientos y protocolos antes de trabajar.

Por ejemplo, las células HeLa, de riesgo 2, tienen el virus del papiloma integrado al DNA y se han observado mRNA de la cápsida del virus (Xiao et al. 2015). En el caso de las 293T, también clasificadas de riesgo 2, se ha observado que expresan el antígeno T grande del virus SV40, el cual ayuda a producir

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 7 de 34

partículas lentivirales, convirtiéndola en una línea de riesgo 2. Además, se ha descrito la relación de este antígeno y la producción de tumores en caso de infección con estas células a hámsters y rata, no obstante, en humanos hay discrepancias al respecto. Algunas investigaciones apuntan que podrían producir ciertos tipos de cáncer, mientras que otros consideran que no hay suficientes datos para confirmarlo (Xiao et al. 2015; Stepanenko & Dmitrenko, 2015; Eddy et al. 1961; Eibl et al. 1994; Lowe et al. 2007).

Cuadro 1. Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo)

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

Grupo de riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (riesgo individual y poblacional elevado)

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Ref: NTP 233: Cabinas de seguridad biológica

Prácticas Recomendadas según el manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4ª edición. CDC NIH:

Tanto las células humanas como también las de los otros primates tienen que ser manipuladas utilizando las prácticas de contención biológica Nivel 2. Todo el trabajo tiene que realizarse en una cabina de Bioseguridad y todo el material tiene que ser descontaminado antes de ser eliminado.

Todos los trabajadores que trabajen con células y tejidos humanos tienen que trabajar conforme a las políticas y guías establecidas por el plan de control de la institución. Los trabajadores tienen que realizarse una muestra de suero de base, recibir la oportunidad de inmunización contra la Hepatitis B y someterse a una evaluación con un profesional de la salud después de un incidente de exposición.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 8 de 34

6. NORMAS BÁSICAS DE LAS SALAS DE CULTIVOS CELULARES

1. En el laboratorio está prohibido comer, beber, fumar, masticar chicle, maquillarse, manipular lentillas y almacenar alimentos o bebidas.
2. El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo. No se podrá entrar con abrigo o chaquetas ni con bolsas o mochilas de calle.
3. Para entrar a las salas de cultivos se tiene que llevar bata limpia de manga larga exclusiva para el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares.
4. Se debe trabajar con mascarilla higiénica durante toda la tarea dentro de las salas, independientemente de que haya más personas en la sala o no.
5. Se recomienda ir con pantalones largos y zapato cerrado.
6. Se deben utilizar guantes en todos los casos que se manipulen células. En el caso de la BioIIA se utilizará doble guante y de nitrilo preferiblemente. El par de guantes de trabajo solo saldrá de la cabina para ser tirado al contenedor biológico.
7. Una vez utilizados se sacarán los guantes de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos. No se debe salir del laboratorio con los guantes de trabajo puestos. Podéis verlo en: <https://www.youtube.com/watch?v=pM8SEp5cLo8>
8. No se puede tocar con los guantes de trabajo puestos el resto del laboratorio ni la puerta.
9. Para trabajar en la sala 3.16 ver el documento DOC-CC-04.
10. La mayoría de equipamientos de las salas (las cabinas de flujo laminar, la hipoxia, la lupa de fluorescencia y las lupas de disección) se deben reservar utilizando el programa *Supersaas* de la web siguiente con una antelación máxima de 24h y mínima de 15 minutos: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanas_flux_laminar
11. Las superficies de trabajo (Campanas, microscopios, poyatas...) se desinfectarán en el inicio y al final de cada uso con Propano-AF (mezcla Isopropanol y EtOH) o "Actril" en el caso de trabajar con material potencialmente peligroso (medio de cultivo con células humanas, virus...).
12. Al acabar de trabajar, se tiene que recoger todo el material utilizado y dejar la zona de trabajo limpia y desinfectada después de su uso.
13. Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados tendrán que ser descontaminados antes de ser eliminados. En el caso de la finalización del uso de un cultivo que se tiene que eliminar, éste se neutralizará primero con lejía, se aspirará el medio neutralizado y se eliminará la placa al contenedor de residuos biológicos.
14. **Los residuos sólidos contaminantes se tirarán en el contenedor de residuos biológicos (hay uno debajo de cada campana).**
15. Los residuos que contengan fármacos o sustancias citotóxicas se tiran en el contenedor azul de citotóxicos. En caso de residuos citotóxicos líquidos se tiran a la garrafa de citotóxicos líquidos si también contienen agentes biológicos se inactivarán previamente con lejía. **Comunicar al personal del servicio la composición de estos residuos líquidos para tomar las medidas de seguridad adecuadas.**
16. EL PAPEL, PLÁSTICO, POREXAN, etc. LIMPIOS y NO CONTAMINADOS van a los CONTENEDORES DE RECICLAJE (situados en los pasillos).

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 9 de 34

17. Si el contenedor negro, azul o amarillo está lleno, cualquier usuario lo puede cerrar adecuadamente y coger uno vacío (dentro de la sala). En el caso de los botes de aspiración de residuos líquidos, primero se neutralizarán con lejía y seguidamente se vaciará el bote en la garrafa de residuos citotóxicos líquidos (junto a la pica).
18. Todos los procedimientos técnicos (vórtex de tubos, pipetear, centrifugar...) se deben hacer de forma que minimice la formación de aerosoles y gotas. Ejemplos: las pipetas largas no se tienen que dejar enganchadas a la pipeta para evitar goteos. Las muestras biológicas que contienen virus o fluidos humanos que se tengan que centrifugar, se utilizará la centrífuga con tapas anti-aerosoles siempre que sea posible. Está prohibido pipetear con la boca.
19. El vacío se debe cerrar después de cada uso para evitar exceso de trabajo de la bomba.
20. **El baño se debe apagar una vez finalizado su uso.** Es importante evitar que quede encendido, se podría quemar la resistencia y podría producir un incendio.
21. **Nunca se tiene que llevar material de Primarios a Líneas, puesto que podría ser fuente de contaminación para las líneas celulares.**
22. El traslado de células entre laboratorios no está permitido excepto con permiso propio del servicio.
23. Todos los derrames, accidentes y/o exposiciones directas (o potenciales) a materiales infecciosos tienen que ser comunicados al responsable del servicio. En cada sala hay un registro donde los usuarios deben escribir tales accidentes e incidentes.
24. Las Cabinas de flujo laminar y las BioIIA **NO** son cabinas extractoras de humos ni tienen filtros de carbón activo, por lo que el uso de productos tóxicos volátiles se valorará previamente con el personal del servicio, en caso de absoluta necesidad y teniendo en cuenta el riesgo biológico que puedan tener las muestras. El uso de estas sustancias en cabina no extractora de humos irá bajo la responsabilidad del / la IP así como cualquier reparación de ésta debida al uso de estos productos.
25. **En el caso de la creación de un OMG en una línea humana (línea hs transformada de manera estable a través de lentivirus, CRISPR-CAS, etc.) ponerse en contacto con el comité de Bioseguridad (comitebioseguretat@irbllleida.cat)**

SOLUCIONES DESINFECTANTES DE LAS SALAS DE CULTIVOS:

- **Etanol 70%:** Efecto inmediato, se tiene que retirar a continuación. No utilizar sobre metacrilato.
- **Etanol 80%:** Efecto inmediato, se tiene que retirar a continuación. No utilizar sobre metacrilato.
- **Propano-AF:** 52% etanol+12% isopropanol. Efecto inmediato, se tiene que retirar a continuación. No utilizar sobre metacrilato,
- **Lejía 70%:** la lejía va perdiendo efecto desinfectante a medida que está en contacto con el aire y la luz. El uso recomendado para desinfecciones en líquidos con microorganismos es al 2% de hipoclorito de sodio. La lejía comercial contiene un 5-6% de hipoclorito de sodio, para que dure una media de 3-4 días se prepara al 70% de lejía el cual quedará al 4% de hipoclorito de sodio.
- **Actril:** producto comercial desinfectante de ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ácido acético. Dejar actuar 10 minutos antes de secar. Es viricida y esporicida.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 10 de 34

7. APARATOS DEL SERVICIO: INSTRUCCIONES DE USO

Contenido:

7.1 Cabinas de Flujo Laminar.....	10
7.2 Incubadores de CO ₂	17
7.3 Microscopios y Lupas.....	18
7.4 Centrífugas.....	20
7.5 Baños.....	21
7.6 Tanques de N ₂	22
7.7 Cámara de Hipòxia.....	23

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 11 de 34

7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:

a. Definición:

Son mesas de trabajo de acero inoxidable, a las cuáles llega aire de flujo laminar previamente filtrado por filtros HEPA confiriendo una superficie de trabajo aséptica evitando la entrada del aire no filtrado turbulento exterior.

Su función es la de mantener un área libre de partículas especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras...) que pudieran acceder al cultivo.

Según el tipo de cabina protegerá:

- el personal de agentes nocivos (químicos o biológicos).
- el producto de los diferentes agentes biológicos contaminantes.
- el medio ambiente (externo a la cabina) de agentes de riesgo biológico

b. Tipo de cabinas:

Cabinas de flujo laminar horizontal

Las cabinas de flujo laminar horizontal son adecuadas para una buena protección del producto, pero no del manipulador, puesto que todo el aire interior se extrae directamente hacia el manipulador. Se debe tener en cuenta que la distribución del material a la campana de flujo horizontal debe ser diferente que a la campana de flujo vertical, puesto que el material de primera línea no queda tan protegido como el que se encuentra al fondo.

Cabinas de flujo laminar vertical

Las cabinas de flujo laminar vertical aseguran una buena protección del producto, y, según su diseño, también una protección parcial del manipulador al no recibir todo el aire proveniente del interior de la campana directamente.

Cabinas de Bioseguridad IIA

La Cabina de bioseguridad clase II protege el producto, el manipulador y el medio ambiente. En las de tipos A1 30% del aire es eliminado en cada ciclo previamente filtrado por HEPAs y el 70% restante recircula. En el interior de la cabina se trabaja con presión negativa confiriendo más seguridad al manipulador. Es la más adecuada por el trabajo con agentes biológicos de riesgo 2 o que requieren un NCB-2.

* **Las cabinas de flujo laminar no se consideran campanas de bioseguridad.** Las campanas de bioseguridad de tipo I son aquellas que protegen el manipulador, pero no a la esterilidad del producto (campanas químicas o de humos).

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 12 de 34

Ejemplos de uso de cabina de Bioseguridad 2:

- Producción de virus lentivirales, retrovirus, otros.
- Infección de líneas celulares o cultivos primarios con partículas virales de riesgo 2.
- Cultivos primarios y manipulación de células humanas.
- Cultivos de líneas humanas catalogadas con riesgo biológico tipo II. Por ejemplo: Células HeLa o 293T.

TIPO DE CABINAS EN FUNCIÓN DEL RIESGO:

		CLASE I	CLASE II TIPO A	CLASE II TIPO B	CLASE III
AGENTES BIOLÓGICOS	GRUPO RIESGO 1	(1)	(1)	(1)	(1)
	GRUPO RIESGO 2	(1)	(1)	(1)	(1)
	GRUPO RIESGO 3	(3)	(2)	(2)	(1)
	GRUPO RIESGO 4	(3)	(3)	(3)	(1)
PRODUCTOS DE ALTA TOXICIDAD CANCERIGENOS SENSIBILIZANTES OTROS		(2) (*)	(1) (*)	(1) (*)	(1) (*)

(1) Totalmente indicada

(2) Puede utilizarse

(3) Uso no recomendado

Ref: NTP 233: Cabinas de seguridad biológica

BIOSEGURIDAD EN LOS DIFERENTES TIPOS DE CULTIVOS CELULARES

CULTIVO CELULAR	CONTENCIÓN
Líneas celulares muy caracterizadas de origen humano o de simios. Líneas celulares no humanas ni de simios, muy caracterizadas con bajo riesgo de infección endógena con patógenos humanos.	Nivel de contención 2 y uso de cabina de bioseguridad
Líneas celulares o cepas no totalmente caracterizadas o autenticados	Nivel de contención 2 y uso de cabina de bioseguridad
Células con patógenos endógenos y células infectadas deliberadamente	Contención adecuada al patógeno
Células sanguíneas humanas, células linfoides, tejido nervioso de origen humano o de simio	Contención adecuada al riesgo potencial

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 13 de 34

PNT DE TRABAJO EN LAS CABINAS

7.1.1.CABINA FLUJO LAMINAR

OPERACIONES PREVIAS

1. RESERVA DE LA CAMPANA EN LA WEB:
https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanas_flux_laminar
2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL
3. PREPARACIÓN SOLUCIÓN DESINFECTANTE
- 4.COLOCACIÓN DE LOS EPIS

- a) Limpiar las superficies de la cabina con solución alcohólica (Propano-AF, (mezcla de etanol y isopropanol) o etanol al 70%) presente a la sala, utilizando la técnica del barrido. A las pantallas de metacrilato usar lejía diluida, el etanol degrada el metacrilato.
- b) Introducir el material, rociado con solución alcohólica a la cabina lo más céntrico posible y debidamente separado para que los rayos ultravioletas puedan llegar a todo el material, y dejando las rejillas de extracción de aire libres para un buen mantenimiento de la asepsia dentro de la campana.
- c) Encender la luz Ultravioleta (UV), son UVC (de alta energía, peligroso por piel y ojos) durante 10'y el flujo (si se puede, sino se encenderá después de los ultravioleta. Pasado este tiempo, parar la luz UVC y encender la luz blanca.
- d) Trabajar con bata de manga larga, mascarilla higiénica (min.) y guantes.

BUENA PRAXIS DENTRO DE LA CABINA

- e) Separar la zona de trabajo en: zona limpia, zona de trabajo y zona sucia.
- f) Introducir medios, muestras y tampones secos de agua del baño y rociar con solución alcohólica previamente.
- g) Trabajar poco a poco y concentrados para evitar movimientos bruscos que provoquen turbulencias (punto de contaminación) y producción de aerosoles.
- h) No pasar los brazos por encima de las muestras abiertas - punto de contaminación
- i) No introducir libretas, calculadoras, cajas de cartón o papel dentro de la campana, - punto de contaminación.
- j) No tocar con los guantes el material estéril que entrará en contacto con las células. En caso de duda, descartar el material o identificar la placa para hacerle un seguimiento.
- k) Abrir el material estéril dentro de la campana. Se debe evitar la reinserción del material ya utilizado al medio de cultivo o tampón.
- l) Para aspirar líquidos, encender la bomba de aspiración y conectáis una pipeta Pasteur en el tubo (si se tienen que aspirar diferentes líquidos es bueno añadir una punta de pipeta amarilla e ir cambiándola por no tener que cambiar cada vez la pipeta Pasteur).
- m) Evitar dejar los tapones de las botellas y tubos directamente en la superficie de la campana

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 14 de 34

(ponerlos y sacarlos cada vez sujetándolos con la mano). Si se debe dejar el tapón en la superficie cara arriba, dejarlo cabeza arriba y lejos del área de trabajo, para no pasar el brazo por encima.

RESIDUOS

- n) Tirar el material que ha estado en contacto con la muestra biológica en el contenedor de residuos biológicos.
- o) Para eliminar células, aspirar el medio, añadir lejía diluida durante 5-15 minutos, aspirarlo y descartar la placa a los residuos biológicos.
- p) Echar la pipeta Pasteur de aspiración en el contenedor de residuos biológico y desinfectar el tubo de aspiración primero con lejía al 70% y después con solución alcohólica hasta que no queden restos de medio de cultivo en el tubo y el depósito de residuos líquidos vire a color neutro (sin color).
- q) Los residuos citotóxicos se tiran al contenedor para citotóxicos (azul) o a la garrafa presente en la sala.

FINALIZACIÓN

- r) Limpiar la superficie de la cabina y desinfectarla con Propano-AF o Actril (teniendo en cuenta las medidas de seguridad) y dejar los UV funcionando 10-20 minutos mínimo.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 15 de 34

7.1.2.CABINA BIOSEGURIDAD II (BIOIIA)

OPERACIONES PREVIAS

1. PREPARACIÓN DE MATERIAL
2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DESINFECTANTES
3. PREPARACIÓN DE ZONA DE DESCONTAMINACIÓN DE MATERIAL CON DESINFECTANTE
4. COLOCACIÓN DE LOS EPIS

- a) Antes de hacer ningún procedimiento, se limpiarán las superficies de la campana con la solución alcohólica presente a la sala del 80% min. en alcohol o Actril® usando la técnica del barrido.
- b) Se introducirá todo el material en la campana excepto buffers y muestras, se pondrán en marcha las luces ultravioletas (UV) durante min. 10-15 minutos con la tapa frontal bajada. A continuación, se apagarán los UV y se pondrá en marcha el flujo. Hasta que el flujo no ha recirculado y lleve el caudal adecuado no es seguro trabajar dentro de la campana.
- c) Trabajar con bata de manga larga, mascarilla higiénica (min.) y guantes. En caso de hacer procedimientos con producciones de aerosoles o con riesgo de salpicaduras utilizar gafas de protección ocular y doble bata de manga larga, bata desechable o “manguitos”.
- d) Para trabajar en la BioIIA se utilizará doble guante. Los guantes en contacto con la piel serán de nitrilo. Se recomiendan los de categoría III cumpliendo la EN ISO374-5:2016 (sustituta de la EN374:2003 especificación virus o 374-5). Si se necesita salir de la campana para realizar otra tarea, se deben cambiar los guantes externos antes de tocar cualquiera otra superficie. Una vez utilizados se sacarán de forma aséptica el primer par de guantes. (Se trabajará a unos 10cm en el interior de la campana, evitando tapar las rejillas de extracción del aire para permitir la buena seguridad del usuario.
- e) Dentro la campana tiene que haber el material mínimo imprescindible previamente pensado, para evitar tener que entrar y salir de ésta mientras se trabaja.
- f) Mientras no se trabaje, el interior de la campana tiene que estar vacío. En la Bio-II-A únicamente se mantiene dentro un contenedor amarillo para residuos punzantes.
- g) La aspiración no se podrá utilizar cuando se manipulen muestras humanas.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 16 de 34

ACCIONES A REALIZAR - PROTOCOLO dentro de la BIOIIA

- h) Repartir el espacio de la campana en zona limpia, zona de trabajo y zona sucia.
- i) El material no se debe acumular en un punto, sino que se repartirá para conseguir una buena distribución del flujo y evitar turbulencias.
- j) Trabajar despacio, concentrados evitando los movimientos bruscos que podrían favorecer la producción de aerosoles.
- k) Si el protocolo es de producción de virus, estos virus se deberán guardar al congelador -80 °C del IRBLleida destinado a su almacenamiento, donde estarán debidamente cerrados herméticamente y con indicaciones de peligro biológico.

RESIDUOS

- l) Tirar el material pequeño contaminado (puntas, tubos...) al contenedor de residuos amarillos o a una bolsa desechable de cierre hermético y los residuos punzantes al contenedor de residuos amarillo situado dentro de la campana. Intentando neutralizarlo siempre que sea posible. Los tubos que tienen tapa se tirarán cerrados con su tapa. Una vez finalizado el trabajo, cerrar la bolsa de plástico herméticamente y tirarla al contenedor de residuos biológicos.
- m) Tirar las pipetas largas al vaso de precipitados con agua y jabón que se encuentra dentro de la campana. Al acabar, coger las pipetas largas, esperar que todo el líquido neutralizado se haya escurrido, reintroducirlas en sus envoltorios originales y tirarlas al contenedor de residuos biológicos.

DESCONTAMINACIÓN Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA Y ÁREA DE TRABAJO

- n) Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados o activos deberán ser descontaminados antes de eliminarlos. En el caso de líquidos que se deben eliminar, (si no se pueden cerrar en una bolsa de cierre hermético) se neutralizarán primero con lejía, se colocarán en un bote con tapa y se eliminará la placa/el bote en el contenedor de residuos sólidos. En caso de volúmenes con necesidad de aspiración se tienen que neutralizar con un producto que su rendimiento no se vea afectado por la cantidad de materia orgánica (Actril®, sosa...) pidiendo permiso a los responsables de la sala.
- o) Cuando se acabe de trabajar, retirar los reactivos de la campana descontaminándolos exteriormente con Etanol al 80% o Actril®, descontaminar el material de trabajo y residuos dejándolo dentro de la campana rociado con Etanol al 80% y con las luces UV 10 minutos mínimo. Una vez pasado este tiempo, se tirarán los residuos a su contenedor y se retirará el material de trabajo.
- p) Cualquier material que se deba entrar y/o salir de la campana, se debe limpiar exteriormente con un papel impregnado con solución etanolizada.

Al acabar de trabajar, se debe recoger todo el material utilizado y dejar las campanas vacías, limpias y desinfectadas después de su uso.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 17 de 34

7.2. INCUBADORES DE CO₂:

a. Definición:

El incubador de CO₂ es una cámara que mantiene los cultivos en unas condiciones atmosféricas constantes y óptimas para su crecimiento, al servicio de cultivos están programados para las condiciones óptimas al crecimiento de células de mamífero.

- Temperatura de 37 °C: temperatura fisiológica de las células de mamífero
- Concentración de CO₂ (5%): para mantener el pH adecuado por su crecimiento. El medio de cultivo actúa como la sangre en los animales. El CO₂ se disuelve en el agua formando bicarbonato, la mayoría del CO₂ presente en la sangre se encuentra en forma de bicarbonato (HCO₃⁻), éste actúa como tampón de pH, permitiendo fluctuaciones de gases, nutrientes y metabolitos sin causar cambios peligrosos en el pH sanguíneo).
- Humedad elevada (para evitar la evaporación del agua del medio de cultivo).

Para mantener estas constantes presenta dos puertas, una exterior y una interior de vidrio la cual puede estar templada. L: puerta transparente permite la localización de las placas y evitar aperturas prolongadas. En el interior del incubador hay una bandeja con agua destilada y se produce una recirculación de aire forzado favorecida por los agujeros de las estanterías.

a. Instrucciones de uso:

1. Las placas se deben colocar sobre bandejas para facilitar el depósito de placas en las estanterías del incubador correspondiendo (primarios, líneas, virus) y para evitar derrames en el incubador. Las bandejas son propiedad de cada grupo y son obligatorias.
2. Se debe tener la precaución de no abrir demasiado rato la puerta del incubador para no desestabilizar las constantes atmosféricas del interior. Cerrar la puerta con cuidado.
3. Las placas se deben manipular con guantes o manos etanolizadas para evitar contaminaciones a los cultivos.
4. La manipulación de placas de cultivo se debe hacer con cuidado para evitar derrames cogiéndolas de forma que no se abre la tapa y no pierda la horizontalidad.
5. Las bandejas donde se dejan las placas se tienen que lavar habitualmente por parte del usuario para evitar crecimiento de hongos o bacterias. En caso de derrame a la bandeja, se tiene que absorber con papel mojado en lejía y, finalmente, desinfectarlo con Propano-AF. Si se produce en un experimento con virus, dejar la lejía o la Actril actuar durante 15 minutos. Tiene que informarse al registro de incidencias (P-CC-09) y a los técnicos del servicio.
6. Cuando el derrame se encuentre en el interior de la incubador, se aplicaría el mismo procedimiento que el punto 4, y la comunicación de la incidencia a los técnicos del servicio es absolutamente obligatoria.
7. Si uno de los cultivos se contamina, deberá ser eliminado inmediatamente del incubador y anotado al registro de contaminación (P-CC-10) del laboratorio.
8. Las incubadoras se calibran diariamente automáticamente. Mientras la incubadora se está calibrando **NO** se puede abrir la puerta para evitar realizar una calibración errónea falseando

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 18 de 34

la configuración de las constantes.

7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS

- **Instrucciones generales:**

1. Limpiar los oculares con papel y Propano-AF y la platina donde depositamos la muestra a observar, así evitaremos problemas de contagio de contaminaciones entre usuarios y de los cultivos.
2. Colocar la muestra en la platina, poner los aumentos necesarios y enfocar para visualizar las muestras.
3. Todo usuario debe preguntar para pedir ayuda y formación cuando haya cualquier función del microscopio/lupa desconocida. El usuario NO puede manipular funciones que no conoce del microscopio.
4. Recordar cerrar la luz de microscopios y lupas al acabar de trabajar.
5. En el laboratorio 1.9, 2.16 y -3.16 tapar los microscopios y lupas si sois el último usuario que va a trabajar. Por la noche se encienden los UV en la sala y hay que proteger el equipamiento.

7.3.1 Microscopios de contraste de fases invertidas:

a. Definición:

Permiten hacer el control morfológico de las células vivas dentro del recipiente de cultivo.

El hecho que las muestras a observar se encuentran en recipientes gruesos hace que un microscopio convencional no sea capaz de enfocar y observar las células, por lo cual se han desarrollado microscopios en que la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional.

La segunda característica que condiciona el instrumento óptico es la ausencia de color de la muestra por qué se trata de células vivas que tienen poco contraste y no se pueden teñir sin dañarlas. Para paliarlo, el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases, así el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

7.3.2 Microscopios invertidos o lupas de fluorescencia:

a. Definición:

Son microscopios o lupas como los anteriores pero que cuentan con una bombilla que emite luz a diferentes longitudes de onda permitiendo visualizar imágenes que tienen fluorescencia o que están marcados con fluorocromos.

Tienen una cámara acoplada y conectada a un ordenador para la captación de imágenes para documentar el estado de los cultivos.

b. Instrucciones de uso:

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 19 de 34

- En los microscopios de los laboratorios 3.16 y 3.9, para alargar la vida de la bombilla de fluorescencia de mercurio, una vez encendida no se puede cerrar hasta pasados 15 minutos; y una vez apagada, se debe esperar 10 minutos antes de volver a encender. Para gestionar el mantenimiento de la lámpara de fluorescencia, los usuarios tienen que registrar el número de horas que la bombilla ha trabajado en el formulario de registro P-CC-07.
- Los microscopios y los estereomicroscopios de fluorescencia de otras salas tienen bombillas halógenas o LED.
- Las cámaras asociadas a ellas se pueden utilizar para hacer fotos de los experimentos realizados en las salas de cultivo de tejidos. Cualquier usuario con células vivas tendrá prioridad ante cualquier usuario de células fijadas, incluso si éste ha reservado el microscopio al registro P-CC-06.
- Se deben seguir las instrucciones específicas para cada software. Preguntar a los técnicos del servicio en caso de duda.

7.3.3 Lupas de disección

a. Definición:

Los estereomicroscopios aumentan de 4 a 50 veces la muestra para facilitar la disección del tejido. Se utilizan en los laboratorios de cultivos primarios. Está diseñado para la observación de una muestra a pocos aumentos, normalmente utilizando luz reflejada desde la superficie de un objeto en lugar de transmitirla a través de ella.

- Durante la disección se debe vigilar con el material punzante y el riesgo biológico que conlleva.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 20 de 34

7.4 CENTRÍFUGAS:

a. Definición:

En el laboratorio de cultivos se necesita una centrífuga para la precipitación de las células en suspensión, obtención de tipos celulares por gradientes, concentración de buffers o virus, etc.

b. Instrucciones de uso:

- Poner el tubo o la placa dentro del adaptador del rotor y contrapesar con el mismo volumen en la posición simétrica de la banda opuesta.
- Elegir el programa adecuado y poner en marcha el aparato.
- El programa más común para centrifugar células: 1000 rpm 5' a Temperatura ambiente.
- Si se produce la rotura de un tubo dentro de la centrífuga: antes de abrir-esperar que se depositen los aerosoles que se hayan podido formar, desinfectar con un papel con lejía, dejar actuar la lejía unos 15 minutos dentro de la BioIIA y seguidamente con etanol.
- **Centrifuga con tapa anti-aerosoles**
 - Sacar los cubos con los adaptadores de tubos de la centrífuga y abrir a la campana de BioIIA.
 - Insertar en los adaptadores los tubos cerrados herméticamente.
 - Cerrar los cubos con la tapa antiaerosol y volver a insertarla en la centrífuga.
 - Utilizar el programa adecuado.
 - Una vez acabada la centrifugación y abierta la centrífuga, hay que coger el cubo cerrado a la campana de BioIIA. Se tiene que abrir dentro de la cabina, retirar los tubos y volver a poner el cubo en la centrífuga, comprobando que no se haya producido ningún derrame.
 - Si se produce un derrame al rotor de la centrífuga, el usuario debe esperar para abrirla y así, evitar que se liberen aerosoles. Seguir el PNT-CC-19. Se debe eliminar el material roto con doble guante, esterilizado con lejía o Actril, dejarlo dentro de la campana de BioIIA con luz ultravioleta durante 20 minutos. Todo el material se debe neutralizar y la centrífuga, el rotor, el cubo y los adaptadores de tubos limpiar y esterilizar antes de volverlos a utilizar.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 21 de 34

7.5. BAÑOS:

a. Definición:

Los baños de agua termostáticos se componen de una cubeta donde se deposita el agua y el cabezal, que calienta el agua con la ayuda de una resistencia, y se distribuye una vez se calienta a través de un rotor.

Los baños termostáticos se utilizan para calentar medios de cultivo o tampones, procesar reacciones químicas o descongelar muestras congeladas. Están programados para mantener el agua caliente a 37 °C.

Se llenan de agua no estéril y, puesto que la temperatura que llega el agua es el ideal para el cultivo de microorganismos y algas contaminantes, la precaución de secar bien todos los materiales introducidos en el baño será una norma importante para evitar la contaminación de los cultivos.

Instrucciones de uso:

- La cubeta se tiene que llenar con agua destilada hasta que cubra la resistencia. Algunos baños termostáticos se bloquean si se encienden y no hay bastante agua; en este caso, se tiene que añadir más agua y se tiene que resetear el termostato antes de volverlo a encender.
- Poner en marcha el baño, están programados para trabajar en 37 °C. No se debe cambiar la temperatura sin permiso de los supervisores del laboratorio, tardan unos 15 minutos aproximadamente a lograr la temperatura de 37 °C.
- Los tubos y botellas que se deben introducir al baño tienen que estar fijados de manera segura, con flotadores, racks o pesos, para evitar que se derramen y contaminen el baño y el producto.
- Cuando no haya botellas ni tubos en el baño, se debe apagar.
- En caso de derrame de algún reactivo / células en el baño se avisará al personal técnico para proceder con la descontaminación del mismo.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 22 de 34

7.6. TANQUE DE N₂ LÍQUIDO (-196°C) *(más información en el PNT-CC-18)*:

a. Definición:

Tanque que contiene N₂ líquido el cual tiene un alto poder frigorífico (-196 °C) y se utiliza para almacenar las líneas celulares. Para congelar las células en condiciones adecuadas revisar los protocolos designados para cada línea celular que permiten mantener su viabilidad durante mucho tiempo (años) siempre que no se rompa la cadena de frío.

b. Instrucciones de uso:

- El nitrógeno líquido se debe manipular con guantes y es conveniente proteger los ojos y llevar zapatos tapados para proteger los pies de posibles salpicaduras. El contacto directo con la piel produce quemaduras.
- Los tanques están cerrados y los usuarios deben pedir cita a los supervisores del servicio para abrirlos y recoger o dejar muestras.
- En caso de que un usuario tenga permiso para abrir un tanque solo, tendrá que tener en cuenta el siguiente:
 - El usuario debe saber dónde se encuentran las muestras antes de abrir el tanque para evitar la evaporación excesiva del N₂. El gas N₂ desplaza el oxígeno; los usuarios tienen que leer las normas de seguridad antes de utilizarlo (PNT-CC18).
- Nunca se debe tener un tanque con unos niveles inferior a 15 cm de N₂ (l). Se debe tener en cuenta que el nitrógeno desplaza el oxígeno, de forma que el encargado de llenarlos tiene que estar a cierta distancia del tanque mientras llena los tanques o dewars.

c. Accidentes y seguridad:

En caso de emergencia por derrame de Nitrógeno Líquido, la ventilación debe ser imperativo; las puertas exteriores se deben abrir para facilitar la eliminación del nitrógeno gas. Si hay zonas del cuerpo quemadas actuar según la gravedad del afectado, llamar al 112 o dirigirse a la mutua de acuerdo al tipo de contrato que es tenga (ver capítulo 12).

d. Bioseguridad:

En caso de rotura de un vial celular transformado, se recoge con guantes mientras siga congelado, introducirlo en un tubo de cierre hermético o neutralizarlo con lejía, y rechazar a un contenedor de residuo biológico. En caso de que el tubo ya esté descongelado y se produzca un derrame de agentes biológicos se actuará siguiendo el protocolo de vertidos PNT-CC-19 y se registrará en el registro.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 23 de 34

7.7. CÁMARA DE HIPOXIA

La cámara de hipoxia es una cabina de cultivo celular cerrada herméticamente que permite el control y la regulación de la concentración de oxígeno, CO₂, temperatura y humedad. Tienen la característica que las muestras se pueden introducir, incubar, examinar y sacar sin perder las condiciones ambientales pre-establecidas.

La cabina de hipoxia no es una cabina de Bioseguridad; el aire que expulsa no está filtrado ni es de flujo laminar. Antes de usarla por primera vez, contactar con los técnicos del servicio.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 24 de 34

8. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS

Los cultivos celulares in vitro pueden contaminarse fácilmente puesto que su proporción de crecimiento es menor que la mayoría de los microorganismos y virus que se presenten a su entorno. La mayoría de los cultivos celulares se contaminan con bacterias, hongos y virus. Las bacterias grandes se detectan fácilmente puesto que algunos medios tienen indicadores de color de pH y pueden virar más rápidamente del habitual de rojo a un color amarillo cuando se acidifica el medio, cosa que significa consumo de nutrientes. Se puede detectar un olor específico o a través de un microscopio ver el tipo de bacteria que determina la contaminación. Las bacterias pequeñas como el micoplasma (0,2 μm) no se detectan fácilmente, puesto que no hay síntomas visibles (ver el punto 10 de las directrices). La detección de hongos puede determinarse por medio de microscopios si los hongos tienen la capacidad de gemación y creación de orgánulos filamentosos. La detección de virus solo se puede evaluar mediante técnicas moleculares o antigénicas.

8.1. Focos de contaminación

- Una de las principales fuentes de contaminación en el laboratorio de cultivos celulares es el propio usuario. En los laboratorios de cultivo celular es muy difícil trabajar completamente libre de microorganismos, pero podemos reducir su densidad teniendo en cuenta la fuente de contaminación:

A menudo, los cultivos se contaminan con microorganismos que provienen de las manos, la boca, la cara o la ropa. Para evitar, se tendrían que utilizar guantes, bata larga de laboratorio y lavarse las manos con jabón cada vez que se quiera trabajar, así como desinfectar todo el material y los puños de la bata.

- Otra gran fuente de contaminación es la ropa. El usuario debe utilizar una bata de laboratorio limpia antes de trabajar en el laboratorio y utilizar calzado diferente para ayudar en gran medida a reducir la cantidad de gérmenes a la sala. Utilizar ropa de lana mientras se trabaja a las cabinas es una fuente de contaminación.
- Otro foco muy importante de contaminación son los restos de agua del baño introducidos a la campana y tocados por error. Si dudamos de un medio contaminado, se analiza una alícuota de medio, incubando éste en la sala de incubadores para bacterias, para no poner en riesgo otros cultivos u otros usuarios. En el supuesto de que la contaminación sea de un cultivo de un experimento muy importante, se cambiará el medio con un de nuevo y se subirá la dosis y/o se cambiará el antibiótico.

Métodos básicos de buenas prácticas para evitar contaminaciones:

- ➔ El usuario debe utilizar una bata de laboratorio limpia (específica para trabajar en la sala de cultivos celulares).
- ➔ El usuario debe usar guantes asépticos mientras trabaja.
- ➔ Se recomienda rociar con solución alcohólica manos y mangas.
- ➔ El usuario debe evitar el contacto con el material estéril que entra en contacto con el cultivo.
- ➔ El usuario debe evitar pasar la mano o el brazo sobre del material abierto que estará en contacto directo con la muestra.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 25 de 34

- ➔ El usuario debe trabajar en la parte central de la cabina.
- ➔ Una vez que el usuario está trabajando en la cabina, no debe contestar el teléfono, tocar los pomos de las puertas, rascarse el cabello, la nariz, etc. Él/a tiene que cambiar los guantes si ocurre uno de los anteriores.
- ➔ La superficie de la campana debe estar limpia y vacía antes de trabajar, evitando que el material esté muy cerca el uno del otro.
- ➔ Al retirar cualquier tubo o botella del baño, se debe secar con papel y mojarse y secarse nuevamente con Propano-AF.
- ➔ Los usuarios deben asegurar que el flujo de aire y la luz ultravioleta puedan pasar entre todos los objetos de la campana. Cualquier material poroso como cajas de cartón no se debe introducir dentro de la campana. La superficie de la campana tiene que estar libre de aglomeración de material.
- ➔ Para evitar o minimizar la formación de aerosoles y contaminaciones cruzadas que pueden ocurrir durante el trabajo, el usuario:
 - Debe usar diferentes botellas / tubos de medio, tampones y reactivos, para cada tipo de célula.
 - No debe trabajar en paralelo con más de una línea celular en la campana.
 - No debe trabajar con material no estéril o contaminado (o dudoso).
- ➔ Otro punto importante es como transportar las placas desde la campana hasta el incubador o el microscopio. Este punto es especialmente importante si se transporta material de riesgo biológico: Al principio, la parte exterior de las placas que contienen el cultivo es estéril, pero cuando se retira de este entorno ya no lo es. El usuario debe tener cuidado con su manipulación evitando aperturas por error:
 - Los frascos o placas se debene coger suavemente, evitando movimientos fuertes que puedan derramar el medio o hacer que entren en contacto con la tapa, pero con firmeza al mismo tiempo para garantizar que la tapa no se abre accidentalmente fuera de la campana.
 - Los frascos o placas deben tocarse con guantes limpios o con las manos lavadas con jabón y rociadas con etanol.
 - Los frascos o placas deben colocarse en una bandeja dentro del incubador.
 - Al mirar al microscopio, el usuario debe garantizar la limpieza del portaobjetos.
- ➔ Los cultivos antiguos no deben olvidarse en el incubador, pueden ser una fuente de contaminación para otros cultivos.

9. INSTRUCCIONES EN CASO DE CONTAMINACIÓN:

- Cuando un cultivo está contaminado o lo sospechamos, todos los reactivos utilizados con este cultivo deben ser sustitutos o pasar a cuarentena. Para el segundo caso, se debe incubar una alícuota de medio en la sala de incubadores de bacterias (para no poner en peligro los cultivos de otros usuarios).
- Cuando una placa/pote de cultivo celular está contaminado, se tiene que anotar en el registro de contaminación (P-CC-10) y tiene que eliminarse:

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 26 de 34

- La placa contaminada se debe llevar a una campana BioIIA, minimizando su apertura y agregando producto des contaminantes a la placa (lejía / Acril).
- La descontaminación del producto se debe hacer durante 10 minutos para asegurarnos de su correcta descontaminación.
- El líquido neutralizado se debe aspirar con el sistema de vacío o introducirse en un tubo herméticamente cerrado.
- La placa/frasco se debe rechazar en un contenedor de residuos biológicos.

Si el experimento es insustituible, el usuario puede intentar cambiar el medio, reemplazar todos los reactivos y añadir antibióticos específicos para tratar de salvar el cultivo sin poner en riesgo los cultivos de otros usuarios. El cultivo se tiene que sellar con Parafilm®.

Los cultivos contaminados con micoplasma en los laboratorios de Líneas se tienen que descartar o trasladarse a los laboratorios primarios.

10. CONTROL DE MICOPLASMA:

- El micoplasma es una bacteria que pertenece a la familia de los Mollicutes que incluye más de 180 especies diferentes, pero en cultivos celulares el 95% de estas son, *M. orale*, *M. arginii*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hyorhinae* y *A. laidlawii*. Es el organismo que se autoreplica más pequeño con una medida de entre 0.2-0.8 µm. No tiene pared celular y acostumbra a estar enganchado a la superficie de la membrana celular de otros organismos aprovechándose de sus huéspedes para absorber nutrientes. En la naturaleza se encuentra como parásito en los humanos, mamíferos, reptiles, insectos y plantas.
- El micoplasma crece despacio, no mata las células, pero afecta diferentes parámetros celulares como un aumento a la sensibilidad de inductores de apoptosis, aberraciones cromosómicas, disrupción de la síntesis de DNA, alteraciones en la eficiencia de las transfecciones, inhibición del crecimiento celular, etc.

Para garantizar que las salas de líneas se encuentren libres de Micoplasma, se realizan controles periódicos en los cuales se testan las líneas con que trabajan los usuarios. Para poder llevarlos a cabo los usuarios **deben facilitarnos las muestras siguiendo este protocolo:**

- Recoger **500-1000µl** de sobrenadante del cultivo celular que haya podido estar al menos 48h en contacto con las células (preferiblemente 72h) en un eppendorf de 1'5ml que cierre correctamente y aguante temperaturas de 95°C. No se aceptarán muestras infectadas con virus. Controlar que los tubos estén bien marcados por el usuario. Congelar la muestra y dejarla en el congelador de cultivos de la sala -1.3
- Completar la hoja de **solicitud (P-CC-2)** y entrar via correo electrónico o descargar de la página web (<https://www.irbllleida.org/ca/serveis-cientifico-tecnics/cultius-celulars/>). También informar por correo electrónico de: nombre línea; tipo celular; origen (estocs, mantenimiento...); Nombre de la persona y grupo; Fecha de recogida.
- El análisis por PCR se realizará una vez por semana.
- El resultado se hará saber vía e-mail. Si el resultado es positivo y en caso de que el usuario no opte por destruir las células, los técnicos del servicio están autorizados para exigir el traslado de la línea celular a la sala adecuada de primarios.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 27 de 34

11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERIAS E INCIDENCIAS

- Cualquier incidente ocurrido, la persona que lo encuentra tiene que valorar su urgencia, anotarlo en el registro de incidencias (P-CC-09) y comunicarlo a los supervisores del laboratorio del servicio, en persona, por correo electrónico, llamada telefónica interna n.º 2953 o al móvil 12953 o 664340756.
- Una incidencia es considerada de resolución urgente cuando la no actuación pone en riesgo el trabajo de los usuarios o la viabilidad de las células al incubador. Los técnicos de laboratorio deben tomar las medidas adecuadas y controlar la resolución.
- Cuando la incidencia es urgente y el usuario no puede encontrar ningún técnico del servicio, se tiene que analizar qué acción podría corregir la incidencia y llevarla a cabo, ejemplos:

Incidencia	Actuación
Una de las incubadoras está dañada	Mover todas las placas de todos los usuarios a otras incubadoras que funcionen correctamente.
Todas las incubadoras de un único laboratorio están apagadas, o presentan un fallo del CO ₂	Intentar restablecer el sistema eléctrico (caja de controles al lado de la pica), si no se soluciona, mover todas las placas a otra incubadora de otra sala.
Todas las incubadoras del edificio están apagadas, o tienen fallo del CO ₂	Sellar las incubadoras y evitar que nadie las abra para mantener sus parámetros.
Otros equipos (baño, centrifuga, microscopio, ...) fallan	Los usuarios pueden utilizar excepcionalmente los equipos de las otras salas a excepción de la sala 3.16.
Fallo eléctrico en la sala o el edificio.	Incidencia urgente a la OTI via web http://www.udl.cat/ca/serveis/oti/formulari/salut/

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 28 de 34

12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:

➤ Accidente del manipulador con agentes de riesgo biológico:

La ropa que ha sido contaminada se debe sacar y colocarse en una bolsa de plástico. Debe lavarse con lejía o similar y a alta temperatura. Dependiendo de la severidad del agente, la ropa contaminada será lanzada al contenedor biológico.

Lavar bien la piel y/o herida con agua del grifo (y jabón, dependiendo de la gravedad de la lesión).

Desinfectar con etanol al 70% del área afectada.

Si se trata de una herida abierta, aplicar povidona yodada (Betadine). Dependiendo de la gravedad, el usuario lesionado debe ir al hospital de emergencia apropiado.

DERRAMES

En caso de derrame de líquido con material biológico, seguir el protocolo PNT-CC-19 que encontraréis dentro del Kit de derrame presente en la sala:

1. Cubrir el líquido con papel absorbente o vermiculita e inmediatamente neutralizar con lejía concentrada durante 10-15 minutos.
2. Tirar el material adsorbente en los contenedores de residuos biológicos.
3. Desinfectar las superficies con solución Etanolizada o Actril®.

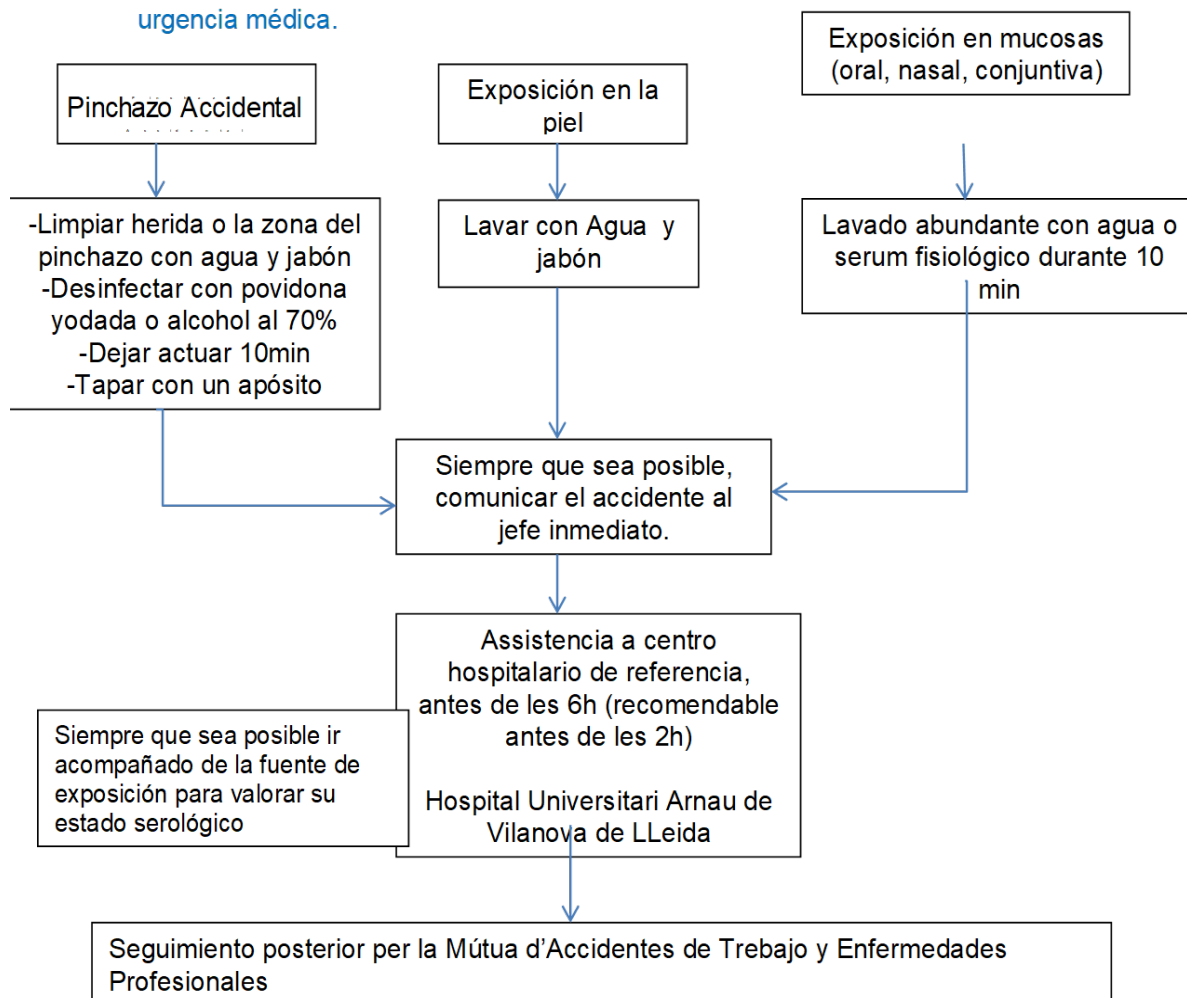
Los accidentes con material de riesgo biológico se deben comunicar siempre al o la IP responsable del investigador/a y al servicio médico para seguir la trazabilidad de una posible enfermedad.

- **NORMA GENERAL:** La mayoría de los agentes de riesgo manipulados se inactivan con lejía (hipoclorito sódico) y Actril. Además, en función del agente también se inactivan con alcohol o jabón. En consecuencia:
- **SOBRE SUPERFÍCIES:** aplicar lejía o Actril, dejar actuar unos 10-15 min. y secar con papel de filtro que se echará al contenedor de biológico después desinfectar con etanol al 70%.
- **SOBRE LA PIEL, ROBA O SUPERFICIES NO RESISTENTES:**
 - Primero sacar la ropa.
 - Lavar con agua corriente sin frotar la piel.
 - Aplicar jabón de manos y aclarar largamente con agua corriente.
 - Desinfectar con etanol al 70%.
 - Si se trata de una herida abierta lavar con agua y jabón y a continuación aplicar solución yodada y apósito.
- **FINALMENTE:**
 - SI ES NECESARIO, LLAMAR AL SERVICIO DE EMERGENCIAS (telf: 112) y / o IR A LA MUTUA INDICADA DEPENDIENDO DE LA ADSCRIPCIÓN AL IRBLLEIDA O A LA UDL.
 - NOTIFICAR A LOS RESPONSABLES DEL SCT Y COMPLETAR UN FORMULARIO DE NOTIFICACIÓN DE ACCIDENTES.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 29 de 34

ACTUACIÓN (Qué Hacer?)

Una exposición a sangre o a cualquier otro material biológico de riesgo es una urgencia médica.



PAS, PDI : <http://www.prevencao.udl.cat/export/sites/Sprl/ca/.galleries/Accident/Que-fer-cas-accident-PAS-PDI.pdf>

ESTUDIANTES :

<http://www.prevencao.udl.cat/export/sites/Sprl/ca/.galleries/Accident/Que-fer-cas-accident-PAS-PDI.pdf>

IRBLleida: <http://www.quironprevencao.com/es>

13. TRANSPORTE DE MUESTRAS DE RIESGO BIOLÓGICO

El transporte de muestras de riesgo biológico es la ruta que hacen las muestras desde el lugar de origen hasta las instalaciones del IRBLleida para su manipulación. El traslado de muestras de riesgo biológico a las diferentes salas del edificio también tendría que seguir estas estrategias siguiendo la norma UN3373:

Las muestras se tienen que guardar en un contenedor primario estanco, a prueba de escapes y debidamente etiquetadas en relación a su contenido.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 30 de 34

Este contenedor primario recubierto de material absorbente para recoger posibles vertidos, debe ir dentro de un contenedor secundario "protector", es decir, robusto, estanco, a prueba de escapes y resistente a desinfectantes químicos.

En caso de transporte regulado (entre centros), hace falta un contenedor terciario correctamente identificado con la muestra que contiene. Las mismas empresas de transporte lo suministran.

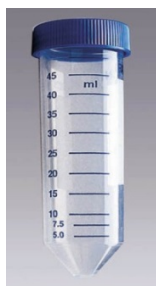
En muestras líquidas:

Tubos o frascos herméticos desechables que contenga la muestra dentro de cajas de plástico (ej. Crioboxes) que permitan mantener los tubos en posición vertical. Estas cajas, a la vez, recubiertas de papel absorbente y dentro de recipientes de plástico grandes y estancos como por ejemplo una nevera portátil tipo camping.

En muestras sólidas:

Frascos o contenedores de plástico desechable con la muestra a su interior, dentro de cajas de plástico estanco, recubiertas con papel absorbente y dentro de recipientes de plástico grande y estanco como podría ser una nevera de camping.

Tubos o frascos herméticos y contenedores: Falcon tubos de 15-50mL, tubos de extracción de sangre...



Contenedores Primarios:



	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 31 de 34

Contenedores secundarios:



Envío reglado:



13.1 Ejemplo de cómo transportar lentivirus correctamente:

Las partículas víricas que están presentes en el medio de cultivo se recogen en tubos de 15 o 50ml. Estos tubos deben cerrar herméticamente y se transportarán en un segundo contenedor hermético de plástico con papel absorbente (ver imagen debajo). Esto minimiza el riesgo de caída y ruptura del tubo con virus.

Los tubos se transportan hasta una sala climatizada para congeladores (sala 3.14). La sala es de acceso restringido con tarjeta para personal autorizado. Un congelador de -80 °C está adecuadamente señalado y es donde se dispondrán los tubos con virus. Estos tubos tienen que estar muy etiquetados como lentivirus defectivos o no replicativos, la fecha de producción, el nombre del gen insertado, la especie de origen y el nombre del investigador productor.

Para su utilización, los tubos se recogen del congelador de -80 °C y se transportan nuevamente a un segundo contenedor hermético de plástico con papel absorbente hasta una cabina de bioseguridad IIA, donde se infectarán las células a estudiar en nivel de contención 2.

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 32 de 34

14. SANCIONES Y AMONESTACIONES

El incumplimiento de estas normas o de las del REGLAMENTO INTERNO del servicio de cultivos (<http://www.irblleida.org/ca/serveis-cientific-tecnics/cultius-celulars/>) se traducirá en avisos al usuario y a su IP. La acumulación de avisos o su severidad puede conducir a amonestaciones. La amonestación más grave es la expulsión del servicio de cultivos.

15. CITACIÓN EN LAS PUBLICACIONES

En las publicaciones, Tesis doctorales o trabajos finales de Máster obtenidos a través de la utilización del servicio, se incluirá una frase en los agradecimientos y se comunicará al servicio. A modo de ejemplo: *The human sample manipulation were performed in the Cell Culture Sientific & technical Service, Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.*

16. TARIFACIÓN

Las tarifas de uso de la sala vienen determinadas por el servicio científico-técnico de Cultivos Celulares aprobadas por la Comisión de Investigación de la UdL y el Consejo de Gobierno anualmente. Se pueden consultar en:

<http://www.udl.es/export/sites/universitat-lleida/ca/recercaNew/serveis-cientific-tecnics/.galleries/SCT-00001/Tarifes-SCT-2020ambindex.pdf>

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 33 de 34

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares. NTP 902. 2011
- ✓ Guía técnica. Exposición a agentes biológicos, Real Decreto 664/1997. Instituto de seguridad e Higiene en el trabajo.
- ✓ Manual de Bioseguridad en el laboratorio tercera edición. OMS
- ✓ Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4ª edición. CDC NIH
- ✓ Biosafety Recommendations on the Handling of Animal Cell Cultures. Herman P and Pauwels K. Chapter 22 Animal cell culture 2015
- ✓ Cabinas de Seguridad Biológica, uso desinfección y Mantenimiento. OMS. 2002
- ✓ Curso de gestión del Riesgo biológico en el uso de muestras humanas para investigación y diagnóstico. Universitat de Lleida. Febrero 2019.
- ✓ UNE-EN12128:1998
- ✓ Xiao, C.Y., Fu, B.B., Li, Z.Y., Mushtaq, G., Kamal, M.A., Li, J.H., Tang, G.C., Xiao, S.S., "Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells", Cancer cell international 2015 15:53
- ✓ Lin Y.C, Boone M., . Meuris L, Lemmens I, Van Roy N., . Soete A, Reumers J., Moisse M., Plaisance S., Drmanac R., Chen J., Speleman F, Lambrechts D., Van de Peer Y., Tavernier J., Callewaert N., "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations". Nat Commun. 2014 Sep 3; 5: 4767.
- ✓ Stepanenko A.&, Dmitrenko V. "HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution". Gene. 2015 Sep 15;569(2):182-90.
- ✓ Eddy BE, Borman GS, Berkeley WH, and Young RD (1961). "Tumors induced in hamsters by injection of rhesus monkey kidney cell extracts". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 107(1):191–197
- ✓ Eibl RH, Kleihues P, Jat PS, Wiestler OD." A model for primitive neuroectodermal tumors in transgenic neural transplants harboring the SV40 large T antigen" Am J Pathol. 1994 Mar;144(3):556-64.
- ✓ Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC (2007). "SV40 association with human malignancies and mechanisms of tumor immunity by large tumor antigen". Cell. Mol. Life Sci. 64 (7–8): 803–14

	DOCUMENTOS SCT-CC			
	DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES			
DOC-CC-02	Edición: 4	Mod: 2	Fecha ed. o mod: 15/09/2020	pág 34 de 34

ANEXO 1. Tareas de mantenimiento de los aparatos y los laboratorios

- Las campanas de flujo laminar se deben desinfectar a fondo mínimo una vez al año o cada vez que haya derrames. Estas pasan una revisión del flujo y del nivel de partículas anual. Su superficie y paredes se tienen que limpiar y desinfectar con alcohol cada vez que se utilicen.
- La campana de hipoxia pasa una revisión una vez al año. El oxígeno se debe calibrar una vez al trimestre.
- Los laboratorios de cultivos deben tener una limpieza básica diaria, así como una de más profunda una o dos veces en el año para minimizar la acumulación de polvo y otras partículas.
- Los tanques de nitrógeno líquido se deben revisar periódicamente asegurando una fase líquida y una de vapor dentro de los tanques donde se guarden las células. Estos se llenarán en función de las necesidades.
- Los niveles de gases de CO₂, N₂ y aire sintético se deben revisar periódicamente para asegurar el suministro a los incubadores que hay en la cámara de hipoxia.
- El incubador debe recibir CO₂ a una presión de 0.8-1.5 bares. Hay que desinfectarlo a fondo (cambio de filtros, desmontaje...) dos o tres veces al año o en función de la necesidad. Durante el resto del año hay que limpiar la base, las puertas y la bandeja de agua periódicamente.
- Los baños se deben limpiar periódicamente con agua y jabón y llenarlos hasta cubrir la resistencia con agua destilada. El cabezal del baño, si suena la alarma puede ser por sobrecalentamiento, hay que añadir más agua al baño y hacerle un reset al cabezal (botón pequeño a la parte posterior a que hay que acceder con una punta de bolígrafo).
- Las luces de los microscopios de mercurio, lupas y luces de fluorescencia se debe cambiar cuando se funden o cuando han sobrepasado su número máximo de horas de vida. En este momento se deben revisar los microscopios y comprobar que las nuevas luces están bien centradas.
- Para cualquier incidente o avería se tiene que contactar con el servicio técnico del aparato en concreto.