



Universitat de Lleida
Serveis Científicotècnics
Laboratori de Cultius
Cel·lulars

DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE CULTIUS
CEL·LULARS

SERVICIO CIENTIFICOTÉCNICO CULTIVOS CELULARES

DIRECTRICES DE FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS DE CULTIVOS CELULARES

DOCUMENTO: **DC-002**
FECHA: **21/06/2022**
REVISIÓN: **5**

ÍNDEX

ÍNDEX	2
1. OBJETIVO:	4
2. ÀMBITO DE APLICACIÓN:	4
3. PERSONAL AUTORIZADO	4
3.1. Datos de los responsables:	4
4. INTRODUCCIÓN	5
4.1. ¿Qué es el cultivo Celular?	5
4.2. Servicio de Cultivos Celulares de Biomedicina, Lleida	5
EQUIPAMIENTO DEL SERVICIO:	6
5. DESCRIPCIÓN DE CULTIVO CELULAR, RIESGOS Y LABORATORIOS:	6
6. NORMAS BÁSICAS DE LAS SALAS DE CULTIVOS CELULARES	9
SOLUCIONES DESINFECTANTES DE LAS SALAS DE CULTIVOS:	11
7. APARATOS DEL SERVICIO: INSTRUCCIONES DE USO.	12
7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:	13
PNT DE TRABAJO EN LAS CABINAS	15
7.1.1. CABINA FLUJO LAMINAR	15
7.1.2. CABINA BIOSEGURIDAD II (BIOIIA)	17
7.1.3. USO DE GERMICIDA EN CABINAS DE BIOSEGURIDAD II	18
7.2. INCUBADORES DE CO ₂ :	20
7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS	21
7.5. BAÑOS:	24
7.6. TANQUE DE N ₂ LÍQUIDO (-196°C)	25
7.7. CÁMARA DE HIPOXIA	26
8. CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS	27
9. INSTRUCCIONES EN CASO DE CONTAMINACIÓN:	28
10. CONTROL DE MICOPLASMA:	29
11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍAS E INCIDENCIAS:	30
12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:	31
13. TRANSPORTE DE MUESTRAS DE RIESGO BIOLÓGICO	33
13.1 Ejemplo de cómo transportar lentivirus correctamente:	34
14. SALA 3.16 PARA LA MANIPULACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DERIVADAS DE PACIENTES	35
15. SANCIONES	35
15. CITACIÓN EN LAS PUBLICACIONES	35



16. TARIFACIÓ.....	35
BIBLIOGRAFIA	36
ANEXO 1. Tareas de mantenimiento de los aparatos y laboratorios.....	37

1. OBJETIVO:

Asegurar que todo el personal que directa o indirectamente trabaje con experimentos donde se utilicen cultivos celulares de mamíferos wild type o transformados de forma estable o temporal (OMG), conozca las normativas y forma adecuada de trabajar en el servicio.

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 es 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 uso de los aparatos, así como las personas responsables a las que dirigirse en caso de averías, contaminaciones, accidentes o sugerencias.

Las instalaciones del Servicio de Cultivos de la UdL-IRBLLeida están acreditadas por el trabajo con OMG de tipo II y por tanto, cumplen con los requisitos de los laboratorios de contención biológico de nivel 2 (NCB-2) con las consecuentes características propias de este nivel y comprometiendo el cumplimiento de normas y protocolos por los usuarios del servicio.

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 podrá entrar el personal autorizado.

Cada usuario tendrá un investigador responsable que se hará cargo de sus experimentos y del cumplimiento de la normativa y de buena praxis dentro del servicio. El IP llenará una ficha de grupo donde mencionará a 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 realizar la facturación. El primer día de entrar en el servicio, los nuevos usuarios llenarán una ficha con sus datos personales y recibirán una explicación de las directrices del servicio. Asimismo, los nuevos usuarios tendrán que acreditar haber entendido y aceptado el reglamento a través de un pequeño test. El servicio se reserva el derecho de admisión en las instalaciones en caso de no cumplir con la normativa establecida en ellas.

3.1. Datos de los responsables:

	Nombre	Localización	e-mail	Ext. Tel.
Coordinadora científica	Judit Ribas	Lab. B2.2	judit.ribas@mex.udl.cat	2936
Responsable Técnico	Marta Rafael	despacho 2.4 Bio. II	mrafel@irblleida.cat	2953 12953
Personal Técnico	Laia Beà	despacho -1.18 Bio. II	laia.bea@udl.cat	3758 12953
Personal Técnico	Rosa Vaquera	despacho -1.18 Bio II	rosa.vaquera@udl.cat	3758 12953

4. INTRODUCCIÓ

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 cultivos primarios.

La característica principal, que define el laboratorio de cultivos celulares, es el mantenimiento de la asepsia ya 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 tanto, para 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, asesorarles 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 Universidad 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 soporte de los técnicos del servicio. El servicio también ofrece la posibilidad de utilizar una sala con NCB-2 para manipular/cultivar muestras humanas.

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

Antes de trabajar con cualquier cultivo putativamente infectado debe comprobarse los requerimientos de Bioseguridad del AB presente o posible en el cultivo (en caso de duda puede consultar páginas oficiales como el RD 664/1997 (<https://www.boe.es/eli/es/rd/1997/05/12/664/dof/spa/pdf>) u otros como <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html> o en la web: <https://www.insst.es/databio-fichas-de-agentes-biologicos> dónde especifica el nivel de bioseguridad necesario para el trabajo con aquellas células. Todas las células humanas o de primates son agentes biológicos de al menos nivel 2 de riesgo y por tanto requieren ser manipuladas en campanas de bioseguridad.

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 celda lular con tanques de Nitrógeno líquido.

- 1. Lab -1.3:** Laboratorio para trabajar con Líneas estables.
- 2. Lab 1.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire independiente con entrada de aire filtrado con HEPA por el trabajo con Líneas estables.



3. **Lab 2.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire con entrada de aire filtrado con HEPA por el trabajo con cultivos primarios.
4. **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.
5. **Lab 3.9:** Laboratorio con presión positiva y circulación de aire con entrada de aire filtrado con HEPA por 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:

17 INCUBADORES DE CO2	17 CAMPANAS DE FLUJO LAMINAR	7 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			

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 puede cultivarse 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 un cierto número de divisiones las células entran en senescencia y dejan de dividirse, generalmente manteniendo la viabilidad. Ocasionalmente, un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas. Este hecho se debe a la aparición de células inmortales en el 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 porque 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 existen diferenciados laboratorios por cultivos primarios y por cultivos de líneas:

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, que exige entre otros:

- Salas independientes del resto del edificio
- Sistema de ventilación independiente y con filtración HEPA.
- Usuarios formados por manipular agentes biológicos
- Acceso restringido a las instalaciones
- Uso de cabinas de bioseguridad por 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, por lo general no presentan un riesgo para el manipulador significativo, la posible inoculación dérmica de este cultivo origina sólo una inflamación local. De todas formas, estos cultivos pueden contribuir sustancialmente al riesgo del manipulador en la exposición a otros agentes biológicos que pueden actuar como base o ayudar a la supervivencia o a la replicación de agentes oportunistas.

Los cultivos de células humanas y de primates pueden contener virus patogénicos entre ellos: 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, cori meningitis linfocítica, virus de la influenza, etc. Así como otros parásitos como la toxoplasmosis o 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 SV-40, EBV o HBV, así como células que contienen material genómico viral. Las células carcinogénicas también resultan peligrosas potenciales 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 las que ha sido clasificada cada línea celular y sus procedimientos y protocolos antes de trabajar con ellos.



Por ejemplo, las células HeLa, de riesgo 2, tienen el virus del papiloma integrado en el DNA y se han observado mRNA de la cápside 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 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 en hámster y rata, sin embargo, en humanos hay discrepancias al respecto. Algunas investigaciones apuntan a que podrían producir ciertos tipos de cáncer, mientras que otras consideran que no hay suficientes fechas 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 otros primates deben ser manipuladas utilizando las prácticas de contención biológica Nivel 2. Todo el trabajo debe realizarse en una cabina de Bioseguridad y todo el material debe ser descontaminado antes de ser eliminado.

Todos los trabajadores que trabajen con células y tejidos humanos deben trabajar conforme a las políticas y guías establecidas por el plan de control de la institución. Los trabajadores deben 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.

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 abrigos o chaquetas ni con bolsas o mochilas de calle.
3. Para entrar en las salas de cultivos se debe llevar bata limpia de manga larga exclusivas para el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares.
4. Se recomienda llevar pantalón largo y zapato cerrado.
5. Se utilizarán guantes en todos los casos en que se manipulen células. En el caso de la BioIIA se utilizará doble guante y de nitrilo preferiblemente. El par de guantes de trabajo sólo saldrá de la cabina para ser arrojado al contenedor biológico.
6. Una vez utilizados se quitarán los guantes de forma aséptica y seguidamente se lavarán las manos. No se debe salir del laboratorio con los guantes de trabajo puestos. Puede verlo en: <https://www.youtube.com/watch?v=pM8SEp5cLo8>
7. No se puede tocar con los guantes de trabajo puestos el resto del laboratorio ni la puerta.
8. La mayoría de equipamientos de las salas deben reservarse utilizando el programa Supersaas de la web siguiente con una antelación máxima de 24h y mínima de 15 minutos:
 - Cabinas de flujo laminar, campanas de Biodeguridad II, microscopios y lupas: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanes_flux_laminar
 - Hipoxia: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Reserva_Hipoxia_SCT_CC
 - Sala 3.16: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Sala_3_16_SCT_CC_Autorizados
9. Los usuarios con células vivas en el microscopio tienen preferencia sobre los que tienen células fijas.
10. Las superficies de trabajo (Campanas, microscopios, poiatas...) se desinfectarán al inicio y al final de cada uso con Propano-AF (mezcla Isopropanol y EtOH)
11. Al terminar de trabajar, se debe recoger todo el material utilizado y dejar la zona de trabajo limpia y desinfectada después de su uso.
12. 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 a eliminar, éste se neutralizará primero con lejía, se aspirará el medio neutralizado y se eliminará la placa en el contenedor de residuos biológicos
13. **Los residuos sólidos contaminados se lanzan a los contenedores de residuo biológico** (uno bajo cada campana).
14. Los residuos que contengan fármacos o sustancias citotóxicas se arrojan al 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. Comunica al



personal del servicio la composición de estos residuos líquidos para tomar las medidas de seguridad adecuadas.

15. EL PAPEL, PLÁSTICO, POREXPAN, etc. LIMPIOS y NO CONTAMINADOS acuden a los CONTENEDORES DE RECICLAJE (situados en los pasillos).
16. Si el contenedor negro, azul, o amarillo está lleno, cualquier usuario puede cerrarlo 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 al fregadero).
17. Todos los procedimientos técnicos (vórtice de tubos, pipetear, centrifugar...) deben realizarse de forma que minimice la formación de aerosoles y gotas. Ejemplos: las pipetas largas no deben dejarse enganchadas a la pipeta para evitar goteo. Las muestras biológicas que contienen virus o fluidos humanos que deban centrifugarse, se utilizará la centrifuga con tapas anti-aerosoles siempre que sea posible. Está prohibido pipetear con la boca.
18. Al finalizar el trabajo dentro de la campana, debe limpiarse el tubo de aspiración con lejía para neutralizar posibles contaminantes o el cultivo en medio y con Propano-AF para eliminar el desinfectante restante del tubo. El vacío debe cerrarse para evitar el uso constante de la bomba.
19. El baño debe apagarse una vez finalizado su uso. Es importante evitar que quede encendido, podría quemarse la resistencia y producir un incendio.
20. **Nunca debe llevarse material de Primarios a Líneas, ya que podría ser fuente de contaminación para las líneas celulares.**
21. El traslado de células entre laboratorios no está permitido salvo permiso propio del servicio.
22. Todos los derrames, accidentes y/o exposiciones directas (o potenciales) a materiales infecciosos deben ser comunicados al responsable del servicio. En cada sala existe un registro donde los usuarios deben escribir tales accidentes e incidentes.
23. 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 IP así como cualquier reparación de ésta debida al uso de estos productos.
24. **En el caso de la creación de un OMG en una línea humana (línea hs transformada de forma 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:

Propano-AF: 52% etanol+12% isopropanol. Efecto inmediato, debe retirarse 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 por desinfecciones en líquidos con microorganismos está en el 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 en el 4% de hipoclorito de sodio.

Virkon: es un desinfectante de amplio espectro. Consiste en peroximonosulfato de potasio como ingrediente activo. Dejar actuar 10 minutos como mínimo antes de aclarar. Tiene actividad bactericida, fungicida, micobactericida, esporicida y viricida. Actualmente solo se encuentra en la sala 3.16.



7. APARATOS DEL SERVICIO: INSTRUCCIONES DE USO.

Contenido:

7.1 Cabinas de Flujo Laminar.....	12
7.2 Incubadores de CO2.....	20
7.3 Microscopios y Lupas.....	21
7.4 Centrifugas.....	23
7.5 Baños.....	24
7.6 Tanques de N2.....	23
7.7 Cámara de Hipoxia.....	26



7.1. CABINAS DE FLUJO LAMINAR:

a. Definición:

Son mesas de trabajo de acero inoxidable, que les 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 distintos agentes biológicos contaminantes.
- el medio ambiente (externo en la cabina) de agentes de riesgo biológico

b. Tipo de cabinas:

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 al producto, al manipulador y al medio ambiente. En las de tipo A, el 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 mayor seguridad al manipulador. Es la más adecuada para el trabajo con agentes biológicos de riesgo 2 o que requieren de 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 al manipulador, pero no a la esterilidad del producto (campanas químicas o de humos).

Ejemplos de uso de cabina de Bioseguridad 2:

- a. Producción de virus lentivirales, retrovirus, otros.
- b. Infección de líneas celulares o cultivos primarios con partículas virales de riesgo 2.
- c. Cultivos primarios y manipulación de células humanas.
- d. 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 TIPO DE CULTIVO CELULAR:

CULTIVO CELULAR	CONTENCIÓN
Líneas celulares bien caracterizadas de origen humano o de simios. Líneas celulares no humanas ni de simios, bien 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 autenticadas	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.



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/Campanes_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 e isopropanol) o etanol al 70%) presente en la sala, utilizando la técnica del barrido. En las pantallas de metacrilato usar lejía diluida, el etanol degrada el metacrilato.
- b) Introducir material, rociado con solución alcohólica en la cabina lo más céntrico posible y dejando las rejillas de extracción de aire libres para un buen mantenimiento de la asepsia dentro de la campana.
- c) Trabajar con bata de manga larga, mascarilla higiénica (min.) y guantes.

BUENA PRÁXIS DENTRO DE LA CABINA

- d) Separar la zona de trabajo en: zona limpia, zona de trabajo y zona sucia.
- e) Introducir medios, muestras y tampones secos de agua del baño y chubascos con solución alcohólica previamente.
- f) Trabajar poco a poco y concentrados para evitar movimientos bruscos que provoquen turbulencias (→ punto de contaminación) y producción de aerosoles.
- g) No pasar los brazos por encima de las muestras abiertas → punto de contaminación
- h) No introducir libretas, calculadoras, cajas de cartón o papel dentro de la campana → punto de contaminación.
- i) No tocar con los guantes el material estéril que va a entrar en contacto con las células. En caso de duda, descartar el material o identificar la placa para realizarle un seguimiento.
- j) Abrir el material estéril en la campana. Se debe evitar la reinserción del material ya utilizado en el medio de cultivo o tampón.
- k) Para aspirar líquidos, encienda la bomba de aspiración y conecte una pipeta Pasteur al tubo (si hay que aspirar diferentes líquidos es bueno añadir una punta de pipeta amarilla e ir cambiándola para no cambiar cada vez la pipeta Pasteur).
- l) Evite dejar los tapones de las botellas y tubos directamente en la superficie de la campana (ponerlos y sacarlos cada vez sujetándolos con la mano). Si es necesario dejar el tapón en la superficie boca arriba, dejarlo boca arriba y lejos del área de trabajo, para no pasar el brazo por encima.



RESIDUOS

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

FINALIZACIÓN

- r) Limpie la superficie de la cabina y desinfecte con Propano-AF o Virkon (teniendo en cuenta las medidas de seguridad).



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 realizar ningún procedimiento, se limpiarán las superficies de la campana con la solución alcohólica presente en la sala del 80% min. en alcohol o Virkon® utilizando la técnica del barrido.
- b) Se pondrá en marcha el flujo. Hasta que el flujo no ha recirculado y lleva 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 realizar 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 UNE EN ISO 374-5:2016 y la ISO16604:2004 (sustituta de la EN374:2003 especificación virus o 374-5). Si se necesita salir de la campana para realizar otra tarea, deben cambiarse los guantes externos antes de tocar cualquier 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 de la campana debe 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 debe estar vacío. En la Bio-II-A únicamente se mantiene dentro un contenedor amarillo para residuos punzantes.

ACCIONES QUE REALIZAR - PROTOCOLO en la BIOIIA

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

RESIDUOS

- k) Tire el material pequeño contaminado (puntas, tubos...) en el contenedor de residuos amarillos o en una bolsa desechable de cierre hermético y los residuos punzantes en el contenedor de residuos amarillo situado dentro de la campana. Intentando neutralizarlo siempre que sea posible. Los tubos que tienen tapa se lanzarán cerrados con su tapa. Una vez finalizado el trabajo, cierre la bolsa de plástico herméticamente y tírela en el contenedor de residuos biológicos.
- l) Tire las pipetas largas en el vaso de precipitados con agua y jabón que puede encontrar dentro de la campana. Al terminar, tome las pipetas largas, espere a que todo el líquido neutralizado se haya escurecido, reintrodúcelas en sus envoltorios originales y tírelas al contenedor de residuos biológicos.



DESCONTAMINACIÓN Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA Y ÁREA DE TRABAJO

- m) Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados o activos tendrán que ser descontaminados antes de eliminarlos. En el caso de líquidos que deben eliminarse, (si no se pueden encerrar en una bolsa de cierre hermético) se neutralizarán primero con lejía o Virkon, 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 deben neutralizar con un producto cuyo rendimiento no se vea afectado por la cantidad de materia orgánica (Virkon, PeraSafe...) pidiendo permiso a los responsables de la sala.
- n) Cuando acabe de trabajar, retira los reactivos de la campana descontaminándolos exteriormente con Etanol al 70% o Virkon®, descontaminando el material de trabajo y residuos dejándolo dentro de la campana rociado con Etanol al 70% un tiempo de actuación de 10 minutos. Pasado este tiempo, se lanzarán los residuos a su contenedor y se retirará el material de trabajo.
- o) Cualquier material que tenga que entrar y/o salir de la campana, debe limpiarse exteriormente con un papel impregnado con solución etanolizada.

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

7.1.3.USO DE GERMICIDA EN CABINAS DE BIOSEGURIDAD II

OBJECTIVO

Regular el uso de germicidas a las cabinas de Bioseguridad II

DEFINICIONES

Siguiendo las recomendaciones de la normativa vigente:

Real Decreto 486/2010, del 23 de abril, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a radiaciones ópticas artificiales

Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con las radiaciones ópticas artificiales

Regular el uso de germicidas en cabinas BIO II

ÁMBITO DE APLICACIÓN

Todas las cabinas BIO II del Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad de Lleida

PROCEDIMIENTO

- 1) Identificar en la puerta de la sala que se está utilizando germicida para evitar la entrada del personal usuario



	Reference No. ISO 7010-W027
	Referent Warning; Optical radiation
	Function To warn of optical radiation
	Image content Star with 11 points with circle in centre
Hazard Optical radiation (such as UV, visible radiation, IR)	
Human behaviour that is intended to be caused after understanding the safety sign's meaning Taking care to avoid injury to eyes and skin when in the vicinity of optical radiation	
Additional information Test data obtained according to ISO 9186-1 are not available from more than one country. Findings from national testing, however, showed that in one country the safety sign did not reach the criteria of acceptability. Consequently, a supplementary text sign shall be used to increase comprehension except when the safety sign is supplemented by manuals, instructions or training. If necessary, a supplementary sign shall be used to give further information about the kind of optical radiation (e.g. UV, visible radiation, IR).	
2) En el momento de encendido y apagado, la persona manipuladora debe tener el cuerpo cubierto y llevar unas gafas de protección ocular a la radiación óptica 3) La puerta de la cabina tiene que estar cerrada durante el uso del germicida 4) La persona manipuladora tiene que responsabilizarse de que la cabina se apaga al finalizar su uso y dar acceso a la sala con el cartel indicador	



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 por las condiciones óptimas en el 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 para su crecimiento. El medio de cultivo actúa como 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, permiten 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 cristal la cual puede estar templada. La puerta transparente permite la localización de las placas y evitar aberturas prolongadas. En el interior del incubador hay una bandeja con agua destilada y se produce una recirculación de aire forzado auspiciada por los agujeros de las estanterías.

b. Instrucciones de uso:

1. Las placas deben colocarse sobre bandejas para facilitar el depósito de placas en las estanterías del incubador correspondiente (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. Cierre la puerta con cuidado.
3. Las placas deben manipularse con guantes o manos etanolizadas para evitar contaminaciones a los cultivos.
4. La manipulación de placas de cultivo debe realizarse con cuidado para evitar derrames cogiéndolas de forma que no se abra la tapa y no pierda la horizontalidad.
5. Las bandejas donde se dejan las placas deben lavarse habitualmente por parte del usuario para evitar crecimiento de hongos o bacterias. En caso de derrame en la bandeja, debe absorberse con papel mojado en lejía y, finalmente, desinfectarlo con Propano-AF. Si se produce en un experimento con virus, dejar la lejía o Virkon actuar durante 15 minutos. Debe informarse en el registro de incidencias y en los técnicos del servicio.
6. Cuando el derrame se encuentre en el interior del incubador, se aplicaría el mismo procedimiento que el punto 4, siendo la comunicación de la incidencia a los técnicos del servicio absolutamente obligatoria.
7. Si uno de los cultivos se contamina, deberá ser eliminado inmediatamente del incubador y anotado en el registro de contaminación del laboratorio.
8. Los incubadores se calibran a diario automáticamente. Mientras el incubador se está calibrando NO se puede abrir la puerta para evitar realizar una calibración errónea falseando la configuración de las constantes.



7.3. MICROSCOPIOS Y LUPAS

- **Instrucciones generales:**

Si necesita usar el microscopio durante mucho rato, resérvelo previamente en el programa. Las células vivas tienen preferencia de uso del microscopio vs. las fijadas.

1. Limpiar los oculares con papel y Propano-AF y la pletina donde depositamos la muestra a observar, evitando así problemas de contagio de contaminaciones entre usuarios y de los cultivos.
2. Colocar la muestra en la pletina, poner los aumentos necesarios y enfocarla para visualizar las muestras.
3. Todo usuario debe preguntar para pedir ayuda y formación cuando exista cualquier función del microscopio/lupa desconocida. El usuario NO puede manipular funciones que no conoce del microscopio
4. Recuerde cerrar la lámpara de microscopios y lupas al terminar de trabajar.

7.3.1 Microscopios de contraste de fases invertidos:

a. **Definición:**

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

El hecho de 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 que se han desarrollado microscopios en los que la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la pletina 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 pueden teñirse sin dañarlas. Para paliarlo, el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases, aumentando así el contraste de la imagen 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 lámpara que emite luz a diferentes longitudes de onda permitiendo visualizar imágenes que tienen fluorescencia o que están marcados con fluorocromos.

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

b. **Instrucciones de uso:**

- En los microscopios de los laboratorios 3.16 y 3.9, para alargar la vida de la bombilla de fluorescencia de mercurio, una vez encendido no se puede cerrar hasta pasados 15 minutos; y una vez apagado, debe esperar 10 minutos antes de volver a encender. Para gestionar el mantenimiento de la lámpara de fluorescencia, los usuarios deben registrar el número de horas que la bombilla debe trabajado en el formulario de registro presente en la sala.



- Los microscopios y estereomicroscopios de fluorescencia de otras salas tienen bombillas halógenas o LED.
- Las cámaras asociadas a ellas se pueden utilizar para tomar fotos de los experimentos realizados en las salas de cultivo de tejidos. Cualquier usuario con células vivas tendrá prioridad frente a cualquier usuario de células fijadas.
- Es necesario seguir instrucciones específicas para cada software. Pregunte a las técnicas 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 bajos aumentos, normalmente utilizando luz reflejada desde la superficie de un objeto en lugar de transmitirla a través de ella.

- Durante la disección debe vigilarse con el material punzante y el riesgo biológico que comporta.



7.4 CENTRÍFUGAS:

a. Definición:

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

b. Instrucciones de uso:

- Ponga el tubo o la placa dentro del adaptador del rotor y contrapese con el mismo volumen en la posición simétrica de la banda opuesta.
- Elija 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 abrirlo espere a que se depositen los aerosoles que se hayan podido formar, desinfecte con un papel con lejía deje actuar la lejía unos 15 minutos dentro de la BioIIA y seguidamente con etanol.
- **Centrifuga con tapa anti-aerosoles**
 - Retire los cubos con los adaptadores de tubos de la centrífuga y ábrelos en la campana de BioIIA.
 - Inserte en los adaptadores los tubos cerrados herméticamente.
 - Cierre los cubos con la tapa antiaerosol y vuelva a insertarla en la centrífuga.
 - Utilice el programa adecuado.
 - Una vez terminada la centrifugación y abierta la centrífuga, es necesario llevar el cubo cerrado a la campana de BioIIA. Se debe abrir dentro de la cabina, retirar los tubos y volver a llevar el cubo a la centrífuga, comprobando que no se haya producido ningún derrame.
 - Si se produce un derrame en el rotor de la centrífuga, el usuario debe esperar para abrirla y así, evitar que se dispersen los aerosoles. Debe eliminarse el material roto con doble guante, aplicando lejía o Virkon, dejado actuar el desinfectante durante un mínimo de 10 minutos y recogiendo los residuos con unas pinzas. Todo el material debe neutralizarse y la centrífuga, el rotor, el cubo y los adaptadores de tubos limpiar y esterilizar antes de volver a utilizarlos.



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 destilada y, puesto que la temperatura que llega el agua es el ideal para el crecimiento de microorganismos y algas contaminantes, la precaución de secar bien y etanolizar todos los materiales introducidos en el baño será una norma importante para evitar contaminación en los cultivos.

Instrucciones de uso:

- La cubeta debe llenarse con agua destilada hasta que cubra la resistencia. Algunos baños termostáticos se bloquean si se encienden si no hay suficiente agua; en este caso, añadir más agua y resetear el cabezal antes de volver a encenderlo.
- Encienda el baño, están programados para trabajar a 37°C. No cambiar la temperatura sin permiso de los supervisores del laboratorio, tardan unos 15 minutos aproximadamente en alcanzar la temperatura de 37 °C.
- Los tubos y botellas que deben introducirse en el baño deben estar fijados de forma segura, con flotadores, racks o pesos, para evitar que se viertan y contaminen el baño y el producto.
- Cuando no haya botellas ni tubos en el baño, debe apagarse.
- En caso de derrame de algún reactivo/células en el baño se avisará al personal técnico para proceder con la descontaminación de este.



7.6. TANQUE DE N₂ LÍQUIDO (-196°C)

a. Definición:

Tanque que contiene N₂ líquido que tiene un alto poder frigorífico (-196°C) y se utiliza para almacenar las líneas celulares. Para congelar las células en condiciones adecuadas revise 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 debe manipularse 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, deberá tener en cuenta lo 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 deben leer las normas de seguridad antes de utilizarlo.
- Nunca debe tenerse un tanque con unos niveles inferior a 15 cm de N₂ (l). Hay que tener en cuenta que el nitrógeno desplaza el oxígeno, por lo que el encargado de llenarlos debe estar a cierta distancia del tanque mientras llena los tanques o Dewar.

c. Accidentes y seguridad:

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

d. Bioseguridad:

En caso de rotura de un vial celular transformado, lo recogeremos con guantes mientras siga congelado, introducirlo en un tubo de cierre hermético o neutralizarlo con lejía, y desecharlo en un contenedor de residuo biológico. En caso de que el tubo ya esté descongelado y se produzca un vertido de agentes biológicos actuaremos siguiendo el protocolo de vertidos y registraremos el registro.



7.7. CÁMARA DE HIPOXIA

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

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

Se debe reservar cada vez que se necesite y por la duración de utilización. En caso de usarla por primera vez, contacte con el servicio.

https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Reserva_Hipoxia_SCT_CC

8. CONTAMINACIÓ 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 presentan en su entorno. La mayoría de los cultivos celulares se contaminan con bacterias, hongos y virus. Las bacterias grandes se detectan fácilmente ya que algunos medios tienen indicadores de color de pH y pueden virar más rápidamente de lo habitual de rojo a un color amarillo cuando se acidifica el medio, lo 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 la micoplasma (0,2 μm) no se detectan fácilmente, ya que no existen 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 sólo puede evaluarse mediante técnicas moleculares o antigénicas.

8.1. Foco de contaminación

- a) 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 proceden de las manos, la boca, la cara o la ropa. Para evitar, deberían utilizarse 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.

- b) 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 en la sala. Utilizar ropa de lana mientras se trabaja en las cabinas es una fuente de contaminación.
- c) Otro foco muy importante de contaminación son los restos de agua del baño introducidos en la campana y tocados por error. Si dudamos de un medio contaminado, analizamos una alícuota de medio, incubando éste en la sala de incubadores para bacterias para no poner en riesgo otros cultivos u otros usuarios. En caso de que la contaminación sea de un cultivo de un experimento muy importante, se cambiará el medio con uno 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 el material abierto que estará en contacto directo con la muestra.
- ➔ El usuario debe trabajar en la parte central de la cabina.



- ➔ Una vez que el usuario está trabajando en la cabina, no debe contestar al teléfono, tocar los pomos de las puertas, rascarse el pelo, la nariz, etc. Él/a debe 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 uno del otro.
- ➔ Al retirar cualquier tubo o botella del baño, deben secarse con papel y mojarse y secarse de nuevo con Propano-AF.
- ➔ Los usuarios deben asegurarse de que el flujo de aire pueda pasar entre todos los objetos de la campana. Cualquier material poroso como cajas de cartón no debe introducirse dentro de la campana. La superficie de la campana debe 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 utilizar 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 cómo 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 ese entorno ya no lo es. El usuario debe tener cuidado con su manipulación evitando aberturas por error:

 - Los frascos o placas deben tomarse 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 abra 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 1 alícuota de medio en la sala de incubadores de bacterias (para no poner en peligro los cultivos de otros usuarios).
- Cuando una placa/bote de cultivo celular está contaminado, debe anotarse en el registro de contaminación y debe eliminarse:
 - La placa contaminada debe llevarse a una campana BioIIA, minimizando su apertura y agregando producto de los contaminantes a la placa (lejía / Virkon).



- La descontaminación del producto debe realizarse durante 10 minutos para asegurarnos de su correcta descontaminación.
- El líquido neutralizado debe aspirarse con el sistema de vacío o introducirse en un tubo herméticamente cerrado.
- La placa/frasco debe rechazarse 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 debe sellarse con Parafilm®.

Los cultivos contaminados con micoplasma en los laboratorios de Líneas deben descartarse 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 éstas son, *M. orale*, *M. arginii*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hyorhinae* y *A. laidlawii*. Es el organismo que se autorreplica más pequeño con una medida de entre 0.2-0.8 µm. No tiene pared celular y suele 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 humanos, mamíferos, reptiles, insectos y plantas.
- La micoplasma crece poco a poco, no mata a las células, pero afecta a diferentes parámetros celulares como un aumento en 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 que se testan las líneas con las que trabajan los usuarios. Para poder llevarlos a cabo los usuarios deben facilitarnos las muestras siguiendo este protocolo:

- Recoja 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. Controle que los tubos estén bien marcados por el usuario.
- Congele la muestra y déjela en el congelador de cultivos de la sala -1.3
- Rellenar la hoja de solicitud: [p-cc-2-solicitud-y-notificacio-resultats-myco_1602582861.doc](https://pcc2.udl.cat/pcc2-solicitud-y-notificacio-resultats-myco_1602582861.doc) (live.com) y entregado vía correo electrónico a sct.cultius@udl.cat o descargado de la pág. Web del IRBLleida y hacerlo llegar a través de correo electrónico:

➤ nombre línea; tipo celular; origen (stocks, 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 por 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.



11. INSTRUCCIONES EN CASO DE AVERÍAS E INCIDENCIAS:

- Cualquier incidente ocurrido, la persona que lo encuentra debe valorar su urgencia, anotarlo en el registro de incidencias y comunicarlo a los supervisores del laboratorio del servicio, en persona, por correo electrónico, llamada telefónica interna nº 2953 o 3758 o en el 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 en el incubador. Las técnicas 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, debe analizarse qué acción podría corregir la incidencia y llevarla a cabo, ejemplos:

Incidencia	Actuación
Uno de los incubadores está dañado	Mover todas las placas de todos los usuarios a otros incubadores que funcionen correctamente.
Todos los incubadores de un único laboratorio están apagados, o presentan un fallo del CO2	Intentar restablecer el sistema eléctrico (caja de controles en el lado del fregadero), si no se soluciona, mover todas las placas a otro incubador de otra sala.
Todos los incubadores del edificio están apagados, o tienen fallo del CO2	Sellar a los incubadores y evitar que nadie los abra para mantener sus parámetros.
Otros equipos (baño, centrifuga, microscopio, ...) fallan	Los usuarios pueden utilizar excepcionalmente los equipos de las demás salas a excepción de la sala 3.16.
Fallo eléctrico en la sala o el edificio.	Incidencia urgente en la OTI vía web http://www.udl.cat/ca/serveis/oti/formulari/salut/

12. INSTRUCCIONES GENERALES EN CASO DE ACCIDENTE:

➤ Accidente del manipulador con agentes de riesgo biológico:

Un accidente puede ser un derrame de material biopeligroso afectando a una persona superficialmente o con lesiones.

La ropa que ha sido contaminada debe quitarse y colocarse en una bolsa de plástico. Deben lavarse con lejía o similar ya alta temperatura. Dependiendo de la severidad del agente, la ropa contaminada será arrojada al contenedor biológico.

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

Desinfectar con etanol en el 70% del área afectada.

Si se trata de una herida abierta, aplique povidona yodada (Betadine) y pegue yeso. Dependiendo de la gravedad, el usuario lesionado debe acudir al hospital de emergencia apropiado.

DERRAMES

En caso de derrame de líquido con material biológico, seguir el protocolo que encontrará 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 absorbente en los contenedores de residuos biológicos.
3. Desinfectar las superficies con solución etanolizada.

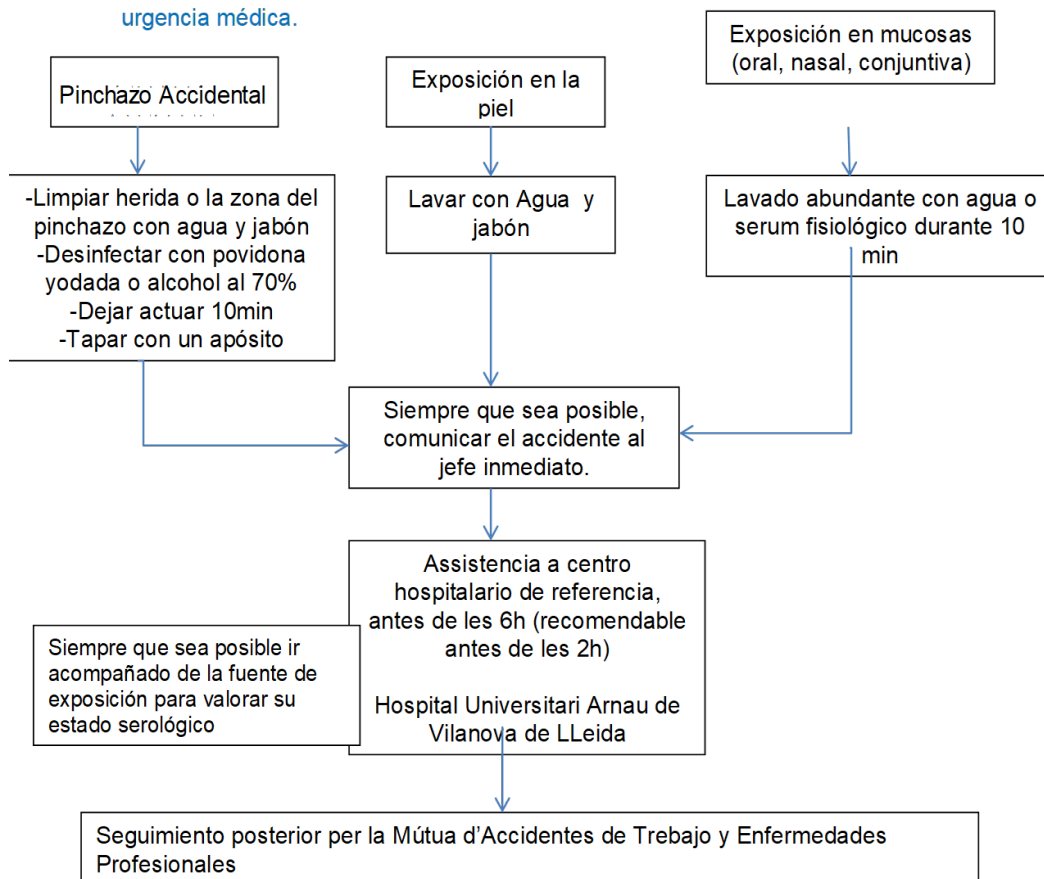
Los accidentes con material de riesgo biológico deben comunicarse siempre al IP responsable del investigador y al servicio médico para seguir la trazabilidad de una posible enfermedad.

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



ACTUACIÓN (Qué Hacer?)

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



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

ESTUDIANTES :

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

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



13. TRANSPORTE DE MUESTRAS DE RIESGO BIOLÓGICO

El transporte de muestras de riesgo biológico es la ruta que realizan 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 debería también seguir estas estrategias siguiendo la norma UN3373:

Las muestras deben guardarse en un contenedor primario estanco, a prueba de fugas y debidamente etiquetadas en relación con su contenido.

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), es necesario un contenedor terciario correctamente identificado con la muestra que contiene. Las propias 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 su vez, recubiertas de papel absorbente y dentro de recipientes de plástico grandes y estancos como una nevera portátil tipo camping.

En muestras sólidas:

Frascos o contenedores de plástico desechables con la muestra en 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:





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 encima). Esto minimiza el riesgo de caída y rotura del tubo con virus.

Los tubos se transportan hasta una sala climatizada para congeladores (sala 3.14). La sala será 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 deben estar bien 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.

Por su utilización, los tubos se recogen del congelador de -80°C y se transportan de nuevo 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.

14. SALA 3.16 PARA LA MANIPULACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DERIVADAS DE PACIENTES

Para poder entrar en la sala 3.16 para la manipulación de muestras biológicas derivadas de pacientes se requiere una formación específica impartida por el SCT-CC. Previamente se deberá haber realizado la formación general de cultivos, también impartida por el SCT-CC

Para poder entrar a trabajar, el protocolo deberá haber estado aceptado por el Comité de Bioseguridad (comitebioseguretat@irblleida.cat), quien se encargará de informar al SCT-CC. La plantilla con la cual se enviará el protocolo se encuentra en la dirección siguiente: <https://www.irblleida.org/ca/sobre-nosaltres/comites-i-comissions/>

15. SANCIONES

El SCT-CC de la UdL quiere implementar un sistema de faltas y sanciones que asegure el cumplimiento de la normativa de trabajo existente a las salas gestionadas por el SCT-CC. El SCT-CC da formación presencial específica a todos los usuarios según el nivel de biocontención que precisan. Los usuarios realizan un examen que los acredita para ser usuarios de cualquier sala (exceptuando la 3.16) y reciben una “acreditación de capacitación de trabajo del SCT-CC”. En caso de los usuarios de la sala 3.16 (Biocontención 2+), se realiza una formación específica seguida de la firma de una “declaración de responsabilidad”. En base al explicado, se considera necesario implementar un sistema de faltas y sanciones que asegure el cumplimiento de las normas y garantice la seguridad de los usuarios, el personal del SCT-CC, personal de servicios presente a Biomedicina y de la población general.

Estas sanciones serán previamente acordadas por la Comisión de Investigación y Consejo de Gobierno

16. 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: La human sample manipulation estaba performed en el Cell Culture Sientific & technical Service, Universidad de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain, o The cell culture experimentos estaba performed en el Cell Culture Sientific & technical Service de la Universidad de Lleida, Lérida, Catalonia, Spain.

17. 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/2022/Tarifes-SCT-2022-amb-index.pdf>

BIBLIOGRAFIA

- ✓ 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 Recomendaciones en el 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. Universidad de Lleida. Febrero 2019.
- ✓ UNE-EN12128:1998
- ✓ Xiao, CY, Fu, BB, Li, ZY, Mushtaq, G., Kamal, MA, Li, JH, Tang, GC, Xiao, SS, "Observaciones en la expresión de humano papillomavirus mayor capsid protein in HeLa cells", Cancer cell international 2015 15:53
- ✓ LinYC, BooneM., MeurisL, LemmensI., Van RoyN., SoeteA, ReumersJ., MoisseM., PlaisanceS., DrmanacR., ChenJ., SpelemanF., LambrechtsD., Van de PeerY., TavernierJ., Callewaert N., "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biological manipulations". Nato 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, y Young RD (1961). "[Tumores inducen in hamsters por inyección de 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 modelo para primitive neuroectodermal tumores in transgénico neural trasplantes harboring the SV40 large T antígeno" Am J Pathol. 1994 Mar; 144(3):556-64.
- ✓ Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC (2007). "SV40 asociación with human malignancias y mecanismos de tumor immunity by large tumor antígeno". Cell. Mol. Life Sci. 64 (7–8): 803–14

ANEXO 1. Tareas de mantenimiento de los aparatos y laboratorios

- Las campanas de flujo laminar deben desinfectarse a fondo mínimo una vez al año o cada vez que haya derrames. Éstas pasan una revisión del flujo y del nivel de partículas anuales. Su superficie y paredes deben limpiarse y desinfectarse con alcohol cada vez que se utilicen.
- La campana de hipoxia pasa una revisión una vez al año. El oxígeno debe calibrarse una vez al trimestre.
- Los laboratorios de cultivos deben tener una limpieza básica diaria, así como una más profunda una o dos veces al año para minimizar la acumulación de polvo y otras partículas.
- Los tanques de nitrógeno líquido deben revisarse periódicamente asegurando una fase líquida y una de vapor dentro de los tanques donde se guarden las células. Éstos se llenarán en función de las necesidades.
- Los niveles de gases de CO₂, N₂ y aire sintético deben revisarse periódicamente para asegurar el suministro a los incubadores existe 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 se debe limpiar la base, las puertas y la bandeja de agua periódicamente.

Los baños deben limpiarse 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, añadir más agua al baño y hacerle un reset al cabezal (botón pequeño en la parte posterior a la que hay que acceder con una punta de bolígrafo).

- Las luces de los microscopios de mercurio, lupas y luces de fluorescencia deben cambiarse cuando se funden o cuando han sobrepasado su número máximo de horas de vida. En este momento deben revisarse los microscopios y comprobar que las nuevas luces están bien centradas.
- Para cualquier incidente o avería debe contactar con el servicio técnico del aparato en concreto.