

NORMATIVA PARA EL USO DE LA UNIDAD DE CULTIVOS CELULARES

1. Instalaciones y equipamiento

La Unidad de Cultivos Celulares de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos se sitúa en el laboratorio 116 del Edificio Departamental I y cumple con los requisitos de los laboratorios de contención biológica de nivel 2 (NCB-2): https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseseguridad_laboratorio.pdf.

La unidad está diseñada para la manipulación de agentes biológicos pertenecientes o asimilados al grupo de riesgo GR2 y para la realización de actividades de contención tipo 2 (ACT2) con organismos modificados genéticamente (OMG) en las que se exige un grado 2 de confinamiento:

- Tejidos, sangre y otros fluidos de origen humano o de otros animales o plantas.
- Líneas celulares establecidas y cultivos primarios de origen humano o de otros animales o plantas.

Es importante destacar que el material biológico de origen humano o de otros primates se asigna automáticamente al grupo de riesgo 2. En este laboratorio, la peligrosidad potencial es muy baja para el público en general y el medio ambiente, pero es moderada para el personal expuesto. Por tanto, es necesario establecer ciertas barreras entre el material biológico y el personal expuesto, manteniendo también determinadas medidas de contención que impidan el escape de material biológico al medio ambiente exterior.

La Unidad de Cultivos Celulares se organiza en diferentes áreas: Antesala de cultivo, Sala de cultivos y Sala de tanques de nitrógeno, cada una con su equipamiento científico (Ver Anexo I):

2. Organización de la Unidad de Cultivos Celulares

2.1. Responsables de la Unidad

Para la correcta organización de la Unidad de Cultivos Celulares se contará con:

- Un **responsable científico**: profesional del PDI, con experiencia previa en cultivos celulares. Esta figura irá rotando cada curso académico entre todos los responsables científicos/investigadores principales de proyecto/directores de grupos de investigación de las áreas usuarias de la instalación.
- Un **responsable técnico**: profesional del PAS (técnico de laboratorio), que se encargará del mantenimiento de las instalaciones y supervisión del buen hacer de los usuarios.

En la puerta de entrada a la sala de cultivos deben aparecer los datos de contacto de los responsables científico y técnico (nombre, teléfono y correo electrónico).

Cualquier asunto relacionado con averías, contaminaciones, accidentes o sugerencias deberá tratarse con los responsables de la Unidad.

2.2. Tareas del responsable científico de la Unidad de Cultivos Celulares

- Registrar y permitir el acceso a la sala de cultivos únicamente al personal investigador autorizado. Para ello, los investigadores responsables (IPs de proyectos o directores de grupo investigador) enviarán la información y contacto de los usuarios interesados al responsable científico, donde se mencione el tipo de células con las que se trabajará y el nivel de bioseguridad que requieren (en caso de duda, consultar páginas oficiales como la ATCC, ECACC, DSMZ o la web: <https://www.insst.es/databio-fichas-de-agentes-biologicos>, donde se especifica el nivel de bioseguridad necesario para el trabajo con dichas células). Cada usuario tendrá, por tanto, un investigador responsable que se hará cargo de sus experimentos y del cumplimiento de la normativa y buena praxis dentro del servicio.
- Velar por el buen funcionamiento de la Unidad, haciendo cumplir las normas básicas de trabajo y uso del equipamiento científico.
- Organizar con el responsable técnico las tareas de limpieza y el mantenimiento de las instalaciones.

2.3. Tareas del responsable técnico de la Unidad de Cultivos Celulares

- Conocer y aplicar las normas que correspondan en cada caso para asegurar la calidad, la gestión de los residuos, la protección ambiental y la prevención de riesgos.
- Colaborar en la elaboración/actualización de las Normas de Uso de la Unidad de cultivos celulares, y vigilancia del cumplimiento de estas normas.
- Controlar el acceso y registro de los usuarios autorizados.
- Supervisar diariamente el correcto mantenimiento y cuidado de las instalaciones y equipos, así como las calibraciones necesarias. Mantener el orden y limpieza de las instalaciones y equipos siguiendo los protocolos y planes establecidos:
 - Mantenimiento preventivo/limpieza de equipos específicos. Hacer un registro de limpieza y definir protocolo de limpieza. Trabajar con Servicio de Limpieza.
 - Supervisión de tanques de nitrógeno: comprobar niveles y planificar el llenado.
 - Revisiones pautadas por SAT autorizado y validación de las campanas e incubadores.
 - Coordinar con el servicio de mantenimiento del campus el cambio de lámparas UV.
 - Gestión del suministro de gases y pedidos de material común, reparaciones y revisiones de equipos. Definir empresa, contacto y protocolo.
 - Gestión y eliminación de los contenedores de residuos. Definir empresa, contacto y protocolo.
 - Cualquier otra tarea que surja y sea necesaria en la Unidad, previo acuerdo con usuarios y responsable científico.
- Planificar la limpieza y notificar a los usuarios con, al menos, una semana de antelación.
- Asesoramiento técnico a los usuarios que lo requieran.
- Comunicar al responsable científico de cualquier incidencia, avería o infracción producidas.

3. Uso de instalaciones

3.1. Control de acceso

- Las instalaciones podrán ser utilizadas por el personal investigador de la Facultad e investigadores externos colaboradores, con conocimiento y experiencia en la técnica de cultivos celulares, previa solicitud por e-mail al responsable científico de la Unidad. La concesión del permiso para acceder a esta instalación conlleva automáticamente al usuario a respetar las normas (leer normativa).
- Los investigadores que se estén formando en la técnica de cultivos celulares, no podrán acceder solos a la unidad, deberán ir siempre acompañados de algún usuario con experiencia.
- El acceso a la sala de cultivos se realizará a través del laboratorio 115, mediante tarjeta de personal de la URJC, previa solicitud a Gerencia de campus. Dentro del laboratorio, las puertas que comunican con la sala de cultivos permanecerán abiertas para facilitar el acceso a los usuarios fuera de horario.
- Para usar el servicio en fin de semana y días festivos, el usuario deberá comunicarlo previamente al responsable científico del servicio y pedir autorización a gerencia y seguridad del campus.

3.2. Reserva de las instalaciones

- Cada usuario podrá reservar el uso de la sala del cultivo y campanas a través de la hoja de reservas ubicada en la puerta de entrada, con el fin de tener una planificación de uso con suficiente antelación. En ella debe constar el nombre de usuario y teléfono, así como el día y horario de uso previsto. La hoja de reserva sirve además como memoria de uso de la instalación, por lo que es imprescindible registrarse.
- Para optimizar el funcionamiento, si no se hace uso de la reserva a partir de los 15 min de la hora fijada, se perderá el derecho a usar la sala en ese periodo.
- Se recomienda no excederse innecesariamente en la previsión temporal ni hacer un uso excesivamente dilatado que impida el trabajo de otros usuarios. El usuario que tiene reserva es preferente en el uso de la sala y equipamiento sobre aquel que no la tenga.
- En caso de que un usuario necesite disponer de la campana durante un tiempo superior a dos horas, deberá comunicarlo con una semana de antelación al técnico responsable para que éste pueda informar al resto de usuarios

Cualquier mal uso observado será informado a los responsables de la Unidad y cuando se detecte alguna rotura o necesidad en la sala de cultivos (luces de las campanas o microscopio fundidas, fallos en la bomba de vacío etc.) se deberá avisar al técnico responsable.

3.3. Normas de uso

3.3.1. Recomendaciones generales

- En caso de situaciones excepcionales, se cumplirán las normas especiales establecidas en ese momento por la Universidad Rey Juan Carlos (medidas de protección, aforo, etc.).

- Es obligatorio utilizar ropa de trabajo específica para trabajar en la sala de cultivos (bata de color, no blanca) y ésta no debe salir de la zona. Los usuarios deberán rotular o identificar sus batas y el cambio de ropa se realizará en la antesala de cultivos.
- Las batas deben lavarse con una periodicidad mensual.
- El material de lavado será de uso común a todos los usuarios.
- A ser posible, llevar el pelo recogido
- Se utilizarán guantes de protección.
- El material fungible (material de vidrio, eppendorfs, medios de cultivo, pipetas, etc.) debe ser aportado por cada investigador. Todas las manipulaciones con material biológico se realizarán en las campanas. Se evitará el uso de mecheros y la acumulación de materiales en el interior de la vitrina para no romper el flujo laminar. Se evitará tapar la zona taladrada donde se apoyan los brazos para no romper el flujo frontal de protección.
- Se evitarán las técnicas que impliquen la formación de aerosoles, o en todo caso se aplicarán barreras de confinamiento si estas técnicas fueran necesarias, normalmente los recintos de contención de las cabinas.
- En caso de utilizar la bomba de vacío para aspirar el contenido de los cultivos celulares, se debe hacer un último aspirado con germicida (Virkon o lejía).
- El material de vidrio se sustituirá por material de plástico si éste estuviera disponible para la misma aplicación (pipetas, frascos, botellas, etc.). Siempre que sea posible, se evitará la utilización de material cortante y punzante.
- Las jeringuillas y agujas hipodérmicas serán de un solo uso y se utilizarán sólo si son absolutamente necesarias (ej: aspiración del contenido de viales con diafragma). Durante su utilización, se adoptará especial atención para evitar la autoinoculación y la generación de aerosoles. Nunca se separará la aguja de la jeringuilla después de su utilización, ni se intentará reencapsular la aguja, depositándose el bloque jeringuilla-aguja en un contenedor específico para inyectables.
- Las superficies de trabajo han de ser descontaminadas tras cada manipulación e inmediatamente después de un vertido accidental. Para ello se utilizarán los germicidas previamente preparados por el responsable técnico.
- Todo el material de incubadores y neveras debe estar identificado con nombre, fecha de uso, apertura o cultivo.
- Cada usuario comprobará diariamente que los cultivos y medios no están contaminados. Si se detecta alguna contaminación se sacará de la nevera o incubador avisando al usuario. Especialmente en estos casos, el material no identificado será regularmente eliminado (ver punto 3.5).
- No utilizar medios caducados o con mucho tiempo de preparación.
- El personal se quitará los guantes y se lavará las manos después de las manipulaciones y cada vez que salga de la unidad de cultivos celulares. El usuario es el responsable de que al acabar esté todo limpio y en orden.

3.3.2. Normas de utilización de las campanas de flujo laminar

- La sala de cultivos cuenta con tres campanas, identificadas según el uso establecido:
 - Campana nº 1: se destinará al trabajo con líneas celulares establecidas.
 - Campana nº 2: se destinará al trabajo con cultivos primarios.
 - Campana nº 3: se destinará al trabajo con cultivos primarios/organoides, y se podrá adaptar a otros, según las necesidades del momento.
- En caso de cualquier cambio, se realizará el mantenimiento y limpieza oportunos, previo aviso a todos los usuarios.
- El usuario será responsable de la limpieza y desinfección de las superficies de trabajo de las campanas tras cada manipulación o inmediatamente después de algún vertido accidental. En este caso, primero se limpiará con un papel y posteriormente se desinfectará con etanol (ver punto 3.5).
- Antes y después de cada uso, las campanas serán limpiadas con papel humedecido en etanol al 70%.
- Se dispondrá de un recipiente de pequeño tamaño dentro de la campana donde puedan ser depositados pequeños materiales usados (puntas de pipetas, eppendorfs, etc.) para evitar la constante entrada y salida de las manos de la campana, y reducir las posibilidades de contaminación. Este recipiente deberá ser vaciado y limpiado por cada usuario después de su uso.

3.3.3. Normas de utilización de los incubadores de CO₂

- La sala de cultivos cuenta con cinco incubadores de uso común, identificados, según el uso establecido:
 - Incubador nº 1: se mantendrá de manera regular a una temperatura de 33°C. Si no se va a hacer uso de este incubador durante un tiempo prolongado, los usuarios deberán comunicarlo al responsable técnico para valorar si se procede al cambio de temperatura a 37°C o su apagado.
 - Incubador nº 2: permanecerá a 37°C para el mantenimiento de cultivos primarios. Se evitará introducir cultivos de líneas establecidas en este incubador.
 - Incubador nº 3: permanecerá a 37°C para el mantenimiento de líneas establecidas.
 - Incubador nº 4: para el cultivo de organoides. Si no se va a hacer uso de este incubador durante un tiempo prolongado, los usuarios deberán comunicarlo al técnico responsable para valorar si se procede al cambio de uso para líneas celulares o su apagado.
 - Incubador nº 5: (*en trámite*) se establecerá su uso, según las necesidades.
- En caso de que algún grupo de investigación cuente con incubador propio, se priorizará el uso de dicho incubador frente a los de uso común para asegurar el correcto reparto del espacio.
- Las placas se deben colocar sobre bandejas para facilitar su almacenaje en las estanterías del incubador correspondiente y para evitar derrames. 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 detectar algún tipo de suciedad y/o contaminación, será comunicado al técnico responsable para su adecuada limpieza. Éste a su vez informará al resto de usuarios de dicha situación.

3.4. Gestión de residuos por usuarios

3.4.1. Residuos biosanitarios sólidos

- *Residuos no cortantes ni punzantes*: se depositarán en los contenedores homologados señalizados como residuos biosanitarios. Los contenedores llenos serán recogidos por el responsable técnico que vigilará diariamente su nivel de llenado.
- *Residuos inyectables, cortantes y punzantes*: se desecharán en contenedores para inyectables previamente señalizados, los cuales, una vez llenos, serán recogidos por el responsable técnico para su eliminación.

3.4.2. Residuos biosanitarios líquidos

- Se eliminarán a través del circuito de aspiración de las cabinas en las trampas preparadas con germicidas de amplio espectro. Se ha de vigilar el estado de llenado de dicha trampa, no rebasando nunca el nivel de llenado máximo marcado en las botellas para evitar que se desborden y se contamine el sistema de vacío. Para mayor seguridad, las trampas siempre dispondrán de una botella de reserva y ambas botellas serán de material autoclavable.
- Las botellas llenas se depositarán en la zona especificada en cada laboratorio por el técnico de cultivos, recambiándose por botellas limpias preparadas con dosis de germicida. Este recambio tendrá una periodicidad mínima semanal.

3.5. Normas de actuación en incidentes, accidentes y emergencias. Incidentes previsibles y normas de actuación

3.5.1. Contaminación de superficies

- Existirán materiales y medios de descontaminación para accidentes y emergencias y, se utilizarán los medios de protección adecuados a cada caso: guantes, gafas, batas desechables, patucos, etc.
- En vertidos poco significativos dentro de sistemas de contención (campanas, incubadores u otros) recoger el vertido con papel secamanos y añadir desinfectante.
- La descontaminación se realizará de la siguiente forma:
 - Recoger el vertido utilizando agentes humectantes / absorbentes (papel secamanos)
 - Rociar la superficie con el germicida (Virkon) y dejar actuar un mínimo de 20 minutos.
 - Todo el material utilizado en la descontaminación se gestionará como residuo biosanitario acondicionándolo en bolsas de autoclave o en un contenedor homologado para residuos biosanitarios.

3.5.2. Contaminación de cultivos celulares

- Si se contamina un cultivo celular, los usuarios, además de eliminar todas las posibles fuentes de contaminación que pudieran afectar al resto, deberán anotarlo en el registro de entrada y comunicarlo al técnico responsable, para que extienda la limpieza de los equipos afectados (campana, incubador, trampa de vacío, etc.). El técnico responsable deberá avisar de la posible contaminación al resto de grupos de investigación que trabajen en la sala de cultivos para que se extremen precauciones y evitar así otras contaminaciones.

4. Mantenimiento de las instalaciones

- El mantenimiento se realizará por el responsable técnico bajo la supervisión del responsable científico. El mantenimiento incluye la limpieza, la comprobación de disponibilidad de los suministros generales (gases, contenedores de nitrógeno, fungible, etc.), así como la supervisión del buen funcionamiento de los equipos y contacto con el servicio técnico necesario en caso de rotura o mal funcionamiento.
- En todo momento se asegurará de que exista todo el material necesario para la limpieza (Ver Anexo 2), así como la preparación de la solución desinfectante/germicida (Virkon, disolución de lejía 1/10, etc.).

4.1. Protocolo de limpieza

- La limpieza de campanas, incubadores, baño, encimeras y centrífuga es primordial para el buen funcionamiento de la unidad. La limpieza debe hacerse a primera hora de la mañana o última de la tarde para no interferir con las actividades de los usuarios.
- Las campanas y los incubadores se limpiarán una vez al mes. La limpieza se hace con 3 ciclos: uno con iodo, otro con sulfato de cobre y otro con etanol 70%.
 - Solución de iodo: añadir en botella de 2 litros de agua (hasta que adquiera coloración rojiza).
 - Solución de sulfato de cobre: añadir sulfato de cobre 1/1000 en botella de 2 litros de agua.
- El baño y la centrífuga se limpiarán una vez a la semana con Virkon, y alguna extra si los usuarios detectaran anomalías.
- Las encimeras se limpiarán diariamente, con etanol 70%.

4.2. Tareas periódicas que realizar

- Protocolo diario:
 - Revisar las trampas de vacío todos los días a primera hora, vaciarlas y añadir un poco de lejía en el matraz.
 - Limpiar las encimeras con etanol 70%.
 - Revisar el baño y rellenarlo con agua, si fuera necesario.
 - Reponer: rollo de papel, etanol, etc., si fuera necesario.

- Comprobar que los gases y la temperatura de los incubadores son correctos.
 - Cambiar los contenedores de residuos (el de placas y el de puntas).
 - Sacar los contenedores llenos fuera de la zona de cultivos.
-
- Protocolo semanal (cada lunes):
 - Comprobar que existen 2 hojas de reservas en la puerta, una para la semana en curso y otra para la siguiente. Esta hoja debe contener un registro detallado de qué usuario ha utilizado qué campana en qué horario. Se debe anotar también la detección de contaminaciones para que los demás usuarios cuenten con la máxima protección.
 - Limpiar el baño y la centrífuga, según el protocolo descrito anteriormente.
 - Cambiar el agua de las bandejas de los incubadores (agua destilada y solución de sulfato de cobre).
 - Revisar que hay suficiente gas en las botellas y nitrógeno en los contenedores. En el caso de que no hubiera, llamar al proveedor para su recambio y/o llenado.
-
- Protocolo mensual (último viernes o primer lunes del mes):
 - Limpiar campanas e incubadores, según protocolo descrito anteriormente.
 - Realizar una PCR para detección de micoplasmas en los medios que los usuarios consideren conveniente.

ANEXOS

ANEXO 1: Instalaciones de la Unidad de Cultivos Celulares y equipamiento científico

- *Antesala de cultivo*: vestuario
- *Sala de cultivos* que dispone de:
 - 3 campanas de flujo laminar.
 - 5 incubadores.
 - Nevera y un congelador pequeño de -20°C.
 - Centrífuga refrigerada de mesa.
 - Microscopio invertido Olympus IX71.
 - Lupa Leica G74.
 - Contador de células BioRad TC20.
 - Pequeño equipamiento: bomba de vacío, vórtex, agitador de placas, un baño de agitación y otro estático.
- *Sala de tanques de nitrógeno*, situada en la sala 114 de la 1ª planta del Edif. Departamental I:
 - 2 tanques de nitrógeno.
 - 2 Dewar de almacenamiento criogénico de células (uno de 4 varillas de 10 cajas, y otro de 6 varillas de 8 cajas).

ANEXO 2: Material de limpieza recomendable

Se podrán utilizar los productos de limpieza que aparecen en la siguiente tabla:

Desinfectante	Concentración	Tiempo de contacto	Utilización
Etanol	70%	1 min	Superficies, excepto metacrilato
Hipoclorito sódico (lejía)	0,1% (1.000 ppm)	10 min	Superficies, excepto acero inoxidable
Hipoclorito sódico (lejía)	1% (10.000 ppm)	10 min	Vertidos o líquidos con carga orgánica, excepto acero inoxidable
Virkon TM	1% (10gr, 1 l)	10 min	Superficies