

NORMAS DE CULTIVO CELULAR

Unidad de Cultivos Celulares

SAI-INCyL

**(Edición noviembre 2025 –
Obligatorias a partir del 15 de
diciembre de 2025)**



NORMAS DE CULTIVO CELULAR

Unidad de Cultivos Celulares – SAI-INCyL

(Edición noviembre 2025 – Obligatorias a partir del 15 de diciembre de 2025)

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| | |
| 2. ÁMBITO DE APLICACIÓN | 6 |
| | |
| 3. ACCESO A LAS SALAS | 7 |
| 3.1. Autorización y formación | |
| 3.2. Registro de usuarios | |
| 3.3. Horario y capacidad máxima | |
| 4. NORMAS DE BIOSEGURIDAD | 9 |
| 4.1. Medidas higiénicas generales | |
| 4.2. Equipos de protección individual (EPI) | |
| 4.3. Asepsia y prevención de contaminaciones | |
| 4.4. Control de contaminaciones (incluido micoplasma) | |
| 4.5. Prevención con objetos punzantes y cortantes | |
| 4.6. Manejo de derrames | |
| 5. CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA CLASE II (CSB-IIA) | 15 |
| 6. GESTIÓN DE RESIDUOS BIOLÓGICOS | 18 |
| 6.1. Contenedores | |
| 6.2. Residuos líquidos | |
| 6.3. Residuos sólidos | |
| 7. NORMAS ESPECÍFICAS PARA TRABAJO CON VECTORES VIRALES ... | 21 |
| 7.1. Autorización y formación | |
| 7.2. Manipulación y transporte | |
| 7.3. Trazabilidad y almacenamiento | |
| 8. NORMAS ESPECÍFICAS PARA TRABAJO CON CÉLULAS MADRE E iPSCs..... | 24 |
| 8.1. Condiciones de cultivo | |
| 8.2. Control de calidad y consideraciones éticas | |
| 8.3. Trazabilidad y prevención de diferenciación | |
| 9. TRABAJO CON ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG) | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 10. MANTENIMIENTO DE EQUIPOS E INSTALACIONES | 29 |
| 11. EMERGENCIAS Y ACCIDENTES BIOLÓGICOS | 31 |
| 12. CAPACITACIÓN Y EVALUACIÓN CONTINUA | 34 |
| 13. CONTACTOS Y RESPONSABLES | 35 |
| 14. BIBLIOGRAFÍA | 36 |
| ANEXO I – Hoja de aceptación y compromiso de cumplimiento (firma obligatoria) | 38 |

1.- INTRODUCCIÓN:

- Las salas de cultivo celular del INCyL está destinada al trabajo con líneas celulares, cultivos primarios (por ejemplo, neuronas embrionarias de ratón), células madre, iPSCs y la preparación de vectores virales (retrovirales, lentivirales y AAVs) para aplicaciones en investigación biomédica, especialmente en neurociencias. Dadas las características de los materiales biológicos y los vectores virales (clasificados como BSL-2), es imprescindible cumplir con normas estrictas de bioseguridad, higiene y buenas prácticas de laboratorio para garantizar la seguridad del personal, la integridad de los experimentos y el cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales (Real Decreto 664/1997, Directiva 2000/54/CE, y guías de la Organización Mundial de la Salud sobre bioseguridad).
- Estas normas serán revisadas anualmente por los responsables de las salas de cultivo, la dirección del INCyL y los Investigadores Principales (IP) cuyos grupos hagan uso de dichas salas o tras cambios en la legislación vigente.
- Los IPs son los responsables últimos de garantizar que los miembros de su grupo de investigación cumplan con estas normas y de reportar cualquier incidente al responsable de las salas y a la dirección del INCyL.
- Todos los usuarios deben firmar este documento tras la formación, aceptando las normas y asegurando su entendimiento. Enviarán una copia firmada de este documento al responsable de las salas y a su IP para su custodia. El IP hará llegar una copia por email a la dirección del INCyL.

2.- ÁMBITO DE APLICACIÓN:

- Estas normas se aplican a todo el personal del INCyL que manipule cultivos celulares o vectores virales clasificados como BSL-2 o inferior en las instalaciones de la Unidad de Cultivos Celulares del SAI-INCyL.
- Estas normas también aplican a colaboradores externos (por ejemplo, estudiantes en prácticas, estudiantes de TFG, de TFM, investigadores visitantes) bajo supervisión del IP.
- Los experimentos con cultivos primarios derivados de animales deben contar con la aprobación previa del Comité de Ética de Experimentación Animal de la USAL.

3.- ACCESO A LAS SALAS:

Autorización:

- Sólo el personal capacitado y autorizado por el responsable de las salas y la dirección del INCyL puede acceder a las salas.
- Los usuarios nuevos deben completar una formación específica en técnicas de cultivo celular y bioseguridad BSL-2, incluyendo el manejo de vectores virales, antes de trabajar en la sala.

- Ningún estudiante de prácticas, estudiante de TFG o de TFM, podrá trabajar solo en las salas de cultivo durante el primer mes de su estancia en el laboratorio, y deberán estar supervisados en todo momento por miembros del laboratorio que tengan permiso para trabajar en estas salas.
- Los IPs son los responsables últimos de garantizar que los miembros de su grupo de investigación sean competentes para trabajar en las salas de cultivo de manera autónoma e independiente.

Registro:

- Cada usuario debe estar registrado por su Investigador Principal (IP), quien proporcionará al responsable de las salas una ficha indicando el nombre del usuario, tipos de cultivos (primarios, líneas celulares, células madre, iPSCs), vectores virales utilizados (si aplica), proyecto asociado y permiso del comité de bioseguridad de la USAL (si aplica).
- Todos los usuarios deben registrarse en el sistema de acceso del INCyL (hoja de registro física o digital) al entrar y al salir, indicando la fecha, hora, propósito de uso, tipo de vector viral utilizado (retrovirus, lentivirus, AAVs) y el número de cabina de bioseguridad empleada.

Horario:

- Las salas estarán disponibles de lunes a viernes, de 08:00 a 21:00.
- Las solicitudes para trabajar fuera del horario establecido (fines de semana o después de las 21:00) deben presentarse por escrito o por email al responsable de la sala y al IP.

Capacidad:

Debe evitarse el número excesivo de usuarios simultáneamente (más de 4) en las salas para evitar hacinamiento y reducir los riesgos de contaminación, especialmente durante la preparación de virus.

4.- NORMAS DE BIOSEGURIDAD.

- Las salas operan bajo nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) debido al uso de líneas celulares humanas (por ejemplo, HEK293-FT), cultivos primarios y vectores virales (retrovirales, lentivirales, AAVs).
- Todos los procedimientos con líneas celulares, cultivos primarios y vectores virales deben realizarse en una cabina de seguridad biológica clase II (CSB-II) con flujo laminar vertical, previamente desinfectada con etanol al 70% y luz UV (15 min).
- Todos los procedimientos deben cumplir con las guías de bioseguridad y seguridad en los laboratorios de la USAL.

- Las salas de cultivo cuentan con luces ultravioleta en el techo para la descontaminación por irradiación UV de las salas. En caso de usar dicha luz debe usarse, solo cuando la sala esté vacía, antes de comenzar el trabajo diario y durante 15-20 minutos, tiempo suficiente para la completa descontaminación de la sala. Un tiempo de uso superior al indicado puede dañar los equipos y las superficies de la sala.
- Al entrar en las salas de cultivo hay que cerciorarse de que la luz UV del techo está apagada. La exposición a luz UV puede causar daños graves en piel y retina.

Medidas higiénicas:

- Lavado de manos: lavarse las manos con agua y jabón líquido antes y después de usar las salas de cultivo, aunque se haya usado guantes. Secarse con papel desechable.
- Heridas: Cubrir las heridas con apósitos impermeables para evitar riesgo de contaminaciones e infecciones.
- Lentillas: Está prohibida la manipulación de lentillas en las salas de cultivo.
- Prohibiciones: No comer, beber, fumar, masticar chicle, maquillarse, ni almacenar alimentos/bebidas en las neveras/congeladores de las salas de cultivo.
- Orden y limpieza: Mantener el laboratorio limpio y ordenado. Guardar ropa (sudaderas, rebecas, chaquetas) y objetos personales (mochilas, cuadernos de laboratorio) fuera de las salas.
- Pipeteo: Prohibido pipetear con la boca. Usar pipeteadores manuales o automáticos con tapones de algodón.
- Puertas: Deben mantenerse cerradas durante el trabajo en las salas.

Equipos de protección individual (EPI):

- Vestimenta: Es obligatorio el uso de calzas desechables y bata de laboratorio limpia y de uso exclusivo para la sala (no debe salir de la zona BSL-2).
- Guantes de nitrilo, cambiados tras cada procedimiento o si se contaminan. Debe usarse SIEMPRE un doble par de guantes para la manipulación de vectores virales o muestras de origen humano.
- No tocar pomos de las puertas, teléfonos ni superficies externas con guantes potencialmente contaminados, especialmente con el segundo par de guantes.
- Retirar guantes asépticamente. Ejemplo de procedimiento en el vídeo: <https://www.youtube.com/watch?v=pM8SEp5cLo8>.

- Gafas y mascarillas: Usar gafas de seguridad y mascarillas quirúrgicas o FFP2 (especialmente durante la preparación de retrovirus o lentivirus) en caso de riesgo de salpicaduras o riesgo de generación de aerosoles fuera de la cabina de seguridad biológica (CSB).
- Si se requiere sacar placas de cultivo/frascos con virus fuera de las salas de cultivo debe realizarse usando un segundo contenedor (por ejemplo, una placa de 15 cm de diámetro cerrada con Parafilm, o un contenedor específico para ese uso) cerrado para evitar derrames en caso de caídas.

Asepsia y prevención de contaminaciones:

- Antes de entrar en las salas de cultivo, los usuarios deben lavarse las manos con jabón líquido.
- Los materiales (pipetas, puntas, tubos) deben esterilizarse previamente en autoclave o ser estériles (pipetas, placas, medios de cultivo y soluciones), y manipularse solo en las CSB-II.
- Los objetos que se introduzcan por primera vez en la sala (botes, contenedores de pipetas, bolígrafos) deben descontaminarse con Etanol al 70% o Isopropanol.
- Las micropipetas deben ser de uso exclusivo de las salas de cultivo y debe evitar sacarlas de estas.
- Las puntas de las micropipetas, así como las pipetas serológicas, deben contener un filtro o algodón para evitar la contaminación por aerosoles y bacterias (especialmente micoplasma), hongos, levaduras y virus.
- Está terminantemente prohibido introducir alimentos y bebidas en las salas de cultivo.
- No introducir los cuadernos de laboratorio en las salas de cultivo si estos se utilizan en los laboratorios normales para evitar la propagación de agentes biológicos, especialmente si se trabaja con cultivos de bacterias o levaduras en dichos laboratorios.

Control de contaminaciones:

- Usar medios de cultivo con antibióticos para cultivos primarios (penicilina/estreptomicina) solo cuando sea estrictamente necesario.
- Es recomendable, aunque no obligatorio, que las líneas celulares se mantengan sin antibióticos para detectar contaminaciones tempranas.
- Monitorizar semanalmente los cultivos bajo microscopio invertido para detectar signos de contaminación (micoplasma, hongos, bacterias, levaduras).
- En caso de contaminación del cultivo suspender el trabajo, descontaminar el cultivo en la propia placa/frasco usando Virkon y desechar el líquido y la

placa/frasco después de 15 minutos. Identificar la fuente, por ejemplo, reactivos, materiales no estériles, técnica del usuario.

- Se realizarán pruebas para la detección de micoplasma cada mes mediante PCR (servicio SAI-INCyL). Para ello los usuarios deben preparar una placa de cultivo de 35mm de diámetro, o similar, con medio sin antibiótico por cada uno de los cultivos celulares que se hayan usado ese mes. Dichos cultivos deben permanecer durante 4 días sin antibióticos. Una vez transcurrido ese tiempo, los usuarios guardarán 1 mL del cultivo a 4°C, así como un pellet celular para su análisis.
- Todas las líneas celulares que se descongelen y que no hayan sido previamente verificadas como libres de micoplasma deben ser testeadas tan pronto como sea posible.
- Todas las líneas que se congelen deben ser testeadas para la presencia de micoplasma.
- Se recomienda el uso del antibiótico Plasmocyn durante 2 semanas en caso de que alguna línea celular esté contaminada por micoplasma y no pueda descartarse debido a su importancia. Trascurrido ese período debe comprobarse la ausencia de micoplasma de manera inmediata y a las 2 semanas de finalizado el tratamiento. El antibiótico Plasmocyn puede usarse de manera profiláctica acorde a las indicaciones de la casa comercial.

Prevención con objetos punzantes y cortantes:

- Evitar, en la medida de lo posible, el uso de jeringuillas.
- Sustituir material de vidrio por plástico siempre que sea posible.
- Manipular objetos punzantes/cortantes con precaución.
- Desechar agujas, sin reencapsular, y vidrio en los contenedores amarillos de bioseguridad.

Manejo de derrames:

- En caso de derrames de materiales biológicos o virales, contener inmediatamente con papel absorbente empapado en una solución de Virkon activo (1%) y dejar actuar durante 15 minutos.
- Desechar el papel en bolsas de autoclave.
- Notificar al responsable de las salas de cultivo, al IP y a la dirección del INCyL.

5.- CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA DE CLASE II TIPO A (CSB-IIA):

Es obligatorio su uso para la manipulación de cultivos humanos, cultivos primarios, líneas celulares transformadas (por ejemplo, HEK293, PC12, N2a) líneas

tumorales, células madre, iPSCs, vectores virales o muestras potencialmente contaminadas en CSB de clase II tipo A.

Está prohibido el uso de mecheros tipo Bunsen dentro de las cabinas. Usar microincineradores en su lugar.

Los materiales introducidos en la CSB-IIA deben ser mínimos para evitar la saturación de la superficie de trabajo, mantener el flujo laminar y evitar derrames dentro de la campana.

Protocolo de trabajo:

- Encender la CSB y activar la luz UV (si está disponible) 15 minutos antes de usarla.
- Verificar el flujo laminar y el filtro HEPA. En caso de problemas avisar al responsable. El mantenimiento sólo se realiza por personal técnico cualificado de manera anual.
- Colocar todo el material necesario dentro de la CSB antes de comenzar a trabajar.
- Desinfectar envases y material antes de introducirlos o extraerlos con Isopropanol o con etanol al 70% (NO usar etanol al 96%).
- Trabajar a 10 cm del borde exterior, evitando obstruir las rejillas de ventilación y sin saturar las superficies de trabajo con material (por ejemplo, pipetas serológicas, frascos de medios, cajas de puntas)
- Evitar las corrientes de aire (puertas, aire acondicionado) durante su uso.
- Evitar movimientos rápidos de manos o brazos dentro de la CSB-IIA para minimizar turbulencias que puedan comprometer la esterilidad.
- Una vez terminado el trabajo, desinfectar las superficies y los materiales con Isopropanol o Etanol al 70%.
- Si se ha trabajado con virus desinfectar la superficie de trabajo con una solución de Virkon activo.

6.- GESTIÓN DE RESIDUOS BIOLÓGICOS

Todo material que se encuentre en las salas de cultivo debe ser considerado como potencialmente como contaminado por agentes con potencial riesgo biológico y por tanto debe ser tratado de manera adecuada.

Contenedores:

- Amarillos: Para objetos punzantes/cortantes (agujas, portaobjetos, vidrio). En caso de que se usen pipetas Pasteur de vidrio hay que extremar la precaución.
- Citotóxicos: Para residuos con fármacos o sustancias citotóxicas.

Residuos líquidos:

- Deben aspirarse con un sistema de aspiración con contenedor/Kitasato conteniendo 1/20 partes de una solución con Virkon activo.
- Antes de descartar el contenido del contenedor/Kitasato se debe añadir de nuevo 1/20 partes del volumen de una solución con Virkon activo, dejar actuar 15 minutos y desechar por la pila.
- Una vez finalizado el trabajo con el sistema de aspiración pasar una pequeña cantidad de Virkon activo por el sistema y pulverizar varias veces con Isopropanol o Etanol al 70%.
- Evitar el uso de lejía/hipoclorito sódico dado que su mezcla con Etanol produce cloroformo y ácido clorhídrico, ambos muy tóxicos. La inhalación de estos vapores puede producir daños en ojos, vías respiratorias, riñones, hígado y sistema nervioso.

Residuos sólidos:

- Todo el material sólido no punzante/cortante debe descartarse en bolsas de autoclave para su posterior esterilización.
- Se evitará llenar las bolsas de autoclave en exceso y se cerrarán con cinta de autoclave antes de proceder a su esterilización.
- Una vez autoclavadas, las bolsas se desecharán en los cubos de residuos normales para su eliminación.
- Todos los residuos sólidos que hayan sido utilizados en la preparación de virus o que hayan estado en contacto con virus se descontaminarán previamente con una solución de Virkon activa durante 15 minutos antes de ser desechadas en las bolsas de autoclave dedicadas exclusivamente a este material.
- Las bolsas de autoclave conteniendo material que haya estado en contacto con virus se mantendrán en un contenedor cerrado y se procederá a su autoclave una vez finalizado el trabajo con virus.
- Se evitará la acumulación de bolsas de autoclave selladas no esterilizadas en las salas de cultivo.

7.- NORMAS ESPECÍFICAS PARA TRABAJO CON VECTORES VIRALES:

- El trabajo con este tipo de vectores requiere la aprobación del Comité de Bioseguridad de la USAL (https://evaluaproyectos.usal.es/main_page.php).
- El IP debe proporcionar una copia de esta aprobación del Comité de Bioseguridad de la USAL al responsable de las salas de cultivo, quien informará a la dirección del INCyL, para autorizar su trabajo con este tipo de vectores

- El IP debe informar tanto al responsable de la sala de cultivos como a la dirección del INCyL de las personas a su cargo que van a usar vectores virales y el tipo de estos.
- Toda persona que realice trabajo con vectores virales debe haber recibido la formación adecuada por parte de su IP y el responsable de las salas de cultivo respecto a las medidas extraordinarias a tomar para trabajar con vectores virales acorde a la legislación vigente.

Manipulación y transporte:

- Es obligatorio el uso de bata con puños y doble par de guantes durante la preparación, purificación y uso de vectores retrovirales y lentivirales. Se recomienda el uso de gafas protectoras y mascarillas de tipo quirúrgico o FFPII para la manipulación de este tipo de vectores.
- Los vectores virales de tipo retrovirus y lentivirus se manipularán exclusivamente dentro de las CSB-IIA debido a su nivel de bioseguridad BSL-2.
- Se extremará la precaución durante la centrifugación de soluciones conteniendo partículas virales. Si se sospechara o se produjera la apertura de los tubos o contenedores durante la centrifugación se parará la centrífuga inmediatamente y NO se procederá a su apertura hasta pasados 30 min, para evitar la liberación de posibles aerosoles.
- TODOS los residuos y materiales utilizados durante la preparación, purificación y uso de los vectores virales se neutralizarán con una solución de Virkon activa durante al menos 15 minutos antes de ser desechados como se indica en el apartado de gestión de residuos biológicos.
- TODOS los tubos, placas, frascos de cultivo, conteniendo partículas virales deben transportarse en contenedores secundarios cerrados durante su transporte fuera de las salas de cultivo para evitar derrames.

Trazabilidad y almacenamiento:

- Todo laboratorio que produzca partículas virales debe llevar un registro, sin violar la confidencialidad, de la producción de éstos indicando fecha, tipo (retrovirus, lentivirus, AAVs) operador que los produjo y lugar de almacenamiento.
- Los congeladores usados para el almacenamiento de partículas virales deben estar debidamente etiquetados con un rótulo que indique “Material Biológico Peligroso” o “Vectores Virales”, incluyendo el nivel de bioseguridad más elevado, por ejemplo, BSL-2 si se almacenan lentivirus (BSL-2) y AAVs (BSL-1.), y una advertencia indicando “Solo personal autorizado”. Dicho rótulo debe incluir además un símbolo internacional de bioseguridad (BIOHAZARD) para mayor claridad.

8.- NORMAS ESPECÍFICAS PARA TRABAJAR CON CÉLULAS MADRE E iPSCs:

El trabajo con células madre, ya sean de ratón, humanas o células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), requiere estrictas medidas de bioseguridad, control de calidad y cumplimiento de normativas éticas y técnicas para garantizar la seguridad del personal, la integridad de las células y la validez de los experimentos.

Recomendaciones sobre condiciones de Cultivo Específicas:

- mESCs: usar medios con inhibidores de diferenciación (por ejemplo, LIF o 2i: PD0325901 y CHIR99021) para mantener la pluripotencia. Cultivar en placas recubiertas con gelatina o *feeders* (como fibroblastos embrionarios de ratón inactivados).
- hESCs e iPSCs: emplear medios libres de xeno (por ejemplo, mTeSR1, Essential 8) en superficies recubiertas con Matrigel o vitronectina. Mantener en incubadoras a 37 °C, 5% CO₂, con control de hipoxia (5% O₂) si es necesario para iPSCs.
- Cambiar el medio cada 1-2 días para evitar la diferenciación espontánea. Usar disociadores suaves (Accutase, TrypLE) para pasajes, controlando la densidad de siembra.

Control de Calidad:

- Verificar la pluripotencia mediante marcadores específicos (Oct4, Nanog, SSEA-4 para hESCs/iPSCs; Oct4, Sox2 para mESCs) al menos cada 10 pasajes.
- Realizar análisis de cariotipo periódicos para detectar anomalías genéticas, especialmente en hESCs e iPSCs.
- Es OBLIGATORIO testear todas las líneas celulares para micoplasmas antes de congelar y después de descongelar, siguiendo los protocolos del apartado 4.

Consideraciones Éticas:

- Para hESCs e iPSCs derivadas de pacientes, obtener aprobación del Comité de Ética de Investigación con Células Madre de la USAL, conforme a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.
- Mantener documentación del consentimiento informado de los donantes en el caso de iPSCs humanas.

Trazabilidad:

- Etiquetar viales de células madre con: tipo de célula, número de pasaje, fecha, iniciales del responsable, y origen (por ejemplo, línea celular o donante).
- Registrar en el cuaderno de laboratorio o sistema digital los detalles de cada manipulación (medios, reactivos, observaciones morfológicas).

Prevención de Diferenciación:

- Evitar el sobrecrecimiento de colonias en hESCs e iPSCs.
- Usar técnicas de microdissección o enzimas específicas para mantener la homogeneidad de los cultivos.

9. TRABAJO CON ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (OMG)

Este apartado aborda las normas específicas para el manejo de OMG (como células modificadas genéticamente o líneas celulares transducidas con vectores virales) en las salas de cultivo, complementando las disposiciones generales de bioseguridad y el apartado 7 sobre vectores virales.

Autorización y Registro:

Todo trabajo con OMG requiere la aprobación previa del Comité de Bioseguridad de la USAL (https://evaluaproyectos.usal.es/main_page.php).

Manipulación:

- Realizar todas las manipulaciones de OMG en cabinas de seguridad biológica clase II tipo A (CSB-IIA), siguiendo los protocolos descritos en el apartado 5.
- Usar doble par de guantes y bata con puños cerrados durante el manejo de OMG generados con vectores retrovirales y lentivirales.

Almacenamiento:

- Almacenar OMG en congeladores (-80 °C o nitrógeno líquido) etiquetados con advertencias de “Material Biológico Modificado Genéticamente” y el símbolo de biohazard, indicando el nivel de bioseguridad (BSL-2).
- Mantener un registro detallado de los OMG almacenados, incluyendo: tipo de célula, modificación genética, fecha, responsable y ubicación exacta.

Eliminación de Residuos:

- Neutralizar todos los residuos sólidos y líquidos de OMG con Virkon activo (1%) durante 15 minutos antes de desecharlos conforme al apartado 6.

- Identificar claramente las bolsas de autoclave con residuos de OMG para evitar mezclas con otros materiales.

Notificación de Incidentes:

- Reportar cualquier derrame, exposición accidental o contaminación de OMG al responsable de la sala, al IP y a la dirección del INCyL de inmediato, siguiendo los procedimientos del apartado 4.

10. MANTENIMIENTO DE EQUIPOS E INSTALACIONES

Limpieza diaria:

Desinfectar superficies con Propano-AF o etanol al 70%.

Limpieza profunda:

Dos veces al año para eliminar polvo y partículas.

Equipos:

- CSB-IIA: Revisión anual de flujo y filtros HEPA.
- Incubadores: Calibración semestral de CO₂ y humedad. Limpiar bandejas con Virkon tras derrames.
- Centrífugas: Verificar rotores y tapas anti-aerosoles anualmente.
- Baños: Cambiar agua destilada mensualmente, usar inhibidores de microorganismos. Si se observa crecimiento de organismo en el agua proceder a su cambio.

Gases:

Revisar niveles de CO₂ y CO₂+O₂ semanalmente (presión 0.8-1.5 bares).

Sistemas de aspiración:

Aspirar Etanol al 70% o Virkon activo (1%) tras cada uso para limpiar tuberías

Reporte de averías:

Notificar a los responsables Javier Herrero (mjaviht@usal.es) y Ana María Marcos (amnaveira@usal.es) ext. 5306/5305.

11. EMERGENCIAS Y ACCIDENTES BIOLÓGICOS

Derrames:

- Recoger vidrio roto con pinzas y guantes dobles.
- Absorber líquido con papel, desinfectar con Virkon (15 minutos), y autoclavar residuos.

Pinchazos/heridas:

- Forzar hemorragia, lavar con agua y jabón, aplicar povidona yodada. Cubrir con apósito impermeable.
- En caso de exposición de la herida a agentes virales, células madre, human-iPSCs, o cualquier línea celular o agente que suponga un riesgo para la salud avisar inmediatamente al IP o los responsables de la Unidad y acudir al servicio de Urgencias de atención primaria o al Hospital.

Salpicaduras en mucosas:

Lavar con suero fisiológico o lavaojos durante 5 minutos.

Ingestión accidental:

Acudir inmediatamente al Servicio Médico de referencia más cercano o al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario de Salamanca.

Reporte:

ES OBLIGATORIO NOTIFICAR todo accidente al IP/Supervisor directo y a los responsables de la Unidad Javier Herrero (mjaviht@usal.es) y Ana María Marcos (amnaveira@usal.es) ext. 5306/5305, quienes llevarán un registro de incidentes y te informarán como poder actuar.

12.- CAPACITACIÓN Y EVALUACIÓN CONTINUA

- Formación inicial: Obligatoria en técnicas asépticas, bioseguridad BSL-2, y manejo de vectores virales/células madre.
- Evaluación bienal: Renovación de certificación mediante talleres prácticos.
- Simulacros bienales: para practicar respuestas a derrames, pinchazos, o fallos eléctricos.

13.- CONTACTOS Y RESPONSABLES

- Coordinador SAI-INCyL: M. Javier Herrero Turrión (mjaviht@usal.es) (<mailto:mjaviht@usal.es>), ext. 5306).
- Técnico Especialista: Ana María Marcos Naviera (amnaveira@usal.es) (<mailto:amnaveira@usal.es>), ext. 5305).
- Emergencias técnicas: Antonio Blanco, UTI-INCyL (ext. 6537).

- Emergencias médicas: Hospital Universitario de Salamanca. 923 29 11 00.

14. BIBLIOGRAFÍA

- RD 664/1997 <https://www.boe.es/eli/es/rd/1997/05/12/664/dof/spa/pdf>.
- RD 178/2004 <https://www.boe.es/eli/es/rd/2004/02/27/178>.
- BASEBiO <https://www.insst.es/databio-fichas-de-agentes-biologicos>.
- Pathogen Safety Data Sheets <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html>.
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª ed., OMS.
- NTP 902: Riesgo biológico en cultivos celulares.
- NTP 233: Cabinas de seguridad biológica.
- NIH Guidelines for Research Involving Recombinant or Synthetic Nucleic Acid Molecules <https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/>.
- Culture of Human Stem Cells, Freshney et al., 2007.

ANEXO I – DECLARACIÓN DE CONOCIMIENTO Y COMPROMISO DE CUMPLIMIENTO

(Debe ser firmado por TODOS los usuarios de las salas de cultivo celular antes de comenzar a trabajar en las salas y enviado al responsable del SAI-INCyL)

Yo, _____

DNI/Nº Pasaporte: _____

Cargo/Condición: Investigador Principal Personal investigador Personal técnico

Estudiante predoctoral Estudiante TFG/TFM Investigador/a visitante Otro:

Grupo de investigación / IP: _____

Correo electrónico institucional:

_____ DECLARO QUE:

1. He recibido, leído y comprendido íntegramente el documento “Normas de Cultivo Celular – Unidad de Cultivos Celulares SAI-INCyL” (obligatorias a partir del 15 de diciembre de 2025).
2. He asistido a la formación específica impartida los días 9 de diciembre de 2025 (o en fecha posterior en caso de incorporaciones posteriores) sobre estas normas y sobre bioseguridad BSL-2, manejo de vectores virales y trabajo con células madre/iPSCs cuando proceda.
3. Me comprometo a cumplir estrictamente todas y cada una de las normas establecidas en dicho documento, así como cualquier actualización futura que se me comunique.
4. Soy consciente de que el incumplimiento de estas normas puede suponer riesgos graves para mi seguridad, la de mis compañeros, la integridad de los experimentos y el cumplimiento legal del centro, pudiendo derivar en la retirada inmediata y definitiva de la autorización para trabajar en las salas de cultivo celular del INCyL.
5. Autorizo al responsable de la Unidad de Cultivos Celulares y a la Dirección del INCyL a conservar esta declaración firmada en mi expediente de usuario de la unidad.

En Salamanca, a ____ de _____ de 20

FIRMA DEL USUARIO

(Firma y nombre completos legible)

