

## Apéndice 2. RIESGOS DERIVADOS DEL TRABAJO CON CULTIVOS CELULARES

### INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares son el resultado del crecimiento “in vitro” de células obtenidas de organismos pluricelulares. Tienen la categoría de agentes biológicos según la definición recogida en el artículo 2 del Real Decreto 664/1997. En dicha categoría se incluyen tanto los cultivos celulares primarios como los de líneas continuas celulares o cepas celulares bien definidas.

Los cultivos celulares no contaminados generalmente presentan un riesgo bajo; la inoculación dérmica solo origina una inflamación local. Sin embargo, estos cultivos pueden contribuir sustancialmente al riesgo de exposición a otros agentes biológicos, ya que permiten o facilitan la supervivencia y/o la replicación de agentes patógenos, o ser origen de otros riesgos potenciales.

### Evaluación de riesgos

La evaluación de riesgos de los cultivos celulares de origen humano o animal se basa en las propiedades intrínsecas del cultivo celular, incluidas las propiedades posteriores adquiridas como consecuencia de una modificación genética y la posibilidad de que el cultivo celular pueda ser deliberada o inadvertidamente contaminado por agentes patógenos. Además, la evaluación de riesgos debe tener en cuenta el tipo de manipulación.

Las propiedades intrínsecas de los cultivos celulares que se deben considerar en la evaluación de riesgos son: la especie origen de las células, el tipo de células o los tejidos de procedencia y el tipo de cultivo. Los cultivos celulares de mayor riesgo son los que proce-

den de primates y de humanos, especialmente si derivan de sangre periférica, tejido linfoide y tejido nervioso (ver tabla 1).

En ningún caso el trabajador que realice los cultivos celulares podrá utilizar sus propias células para el desarrollo “in vitro”. Las células humanas para cultivo deberán obtenerse solamente de individuos que no tengan relación con el trabajo experimental.

En el caso de modificaciones genéticas hay que tener en cuenta que las células recombinantes pueden haber aumentado o disminuido su capacidad de causar daño a las personas y al medio ambiente, en comparación con sus equivalentes no-recombinantes. La evaluación de riesgos de las células recombinantes se realizará atendiendo al Real Decreto 178/2004, por el que se aprueba el Reglamento General para el Desarrollo y Ejecución la Ley 9/2003, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.

El primer paso en el proceso de evaluación consiste en identificar las propiedades que las células recombinantes han adquirido tras la modificación genética. Esto incluye la evaluación de todos los pasos que intervienen en este proceso: propiedades del organismo receptor (célula huésped), propiedades del organismo donante, características y localización del material genético insertado y el vector (ver apéndice 1 “Organismos modificados genéticamente”).

En el caso de cultivos celulares deliberadamente infectados con patógenos, la determinación de los peligros potenciales derivados del cultivo celular infectado requiere un estudio de las propiedades intrínsecas del

Tabla 1. Cultivos celulares. Riesgos según origen y tipo de cultivo.

Especie origen de las células <sup>(1)</sup>	Tipos de células o de tejidos <sup>(2)</sup>	Tipo de cultivo
Orden creciente de riesgo ↓	Orden creciente de riesgo ↓	Orden creciente de riesgo ↓
• Células aviares y células de invertebrados	Fibroblastos y células epiteliales	Cultivo de líneas celulares bien caracterizadas
• Células de mamíferos (ni humanas ni de primates)	Células de la mucosa intestinal	Cultivo de líneas celulares continuas
• Células de primates no humanos	Células endoteliales	Cultivos celulares primarios
• Células humanas		
(1) Cuanto mayor sea la relación genética entre las células del cultivo y las humanas, mayor es el riesgo para los humanos, ya que los agentes patógenos suelen tener barreras de especies específicas. <b>¡ATENCIÓN!</b> Algunos organismos contaminantes podrían cruzar la barrera de las especies habituales (por ejemplo: la gripe H5N1, la EEB, el SRAS, etc.)	Tejido nervioso	
	Células hematopoyéticas	
	(2) Tomar en consideración que algunos tipos de células son capaces de inducir tumores.	

agente patógeno. El riesgo biológico del cultivo celular infectado dependerá del riesgo biológico del patógeno que lo ha infectado.

La presencia de agentes contaminantes adventicios, probablemente constituye el principal peligro asociado a la manipulación de cultivos celulares, ya que a menudo son difíciles de detectar. Los principales contaminantes adventicios son: bacterias, hongos, parásitos, micoplasmas, virus y priones. Esta contaminación puede provenir de las propias células (por ejemplo, animales o tejidos infectados) o bien producirse en el proceso de manipulación del cultivo o por el empleo de reactivos biológicos contaminados.

Finalmente, en la evaluación de riesgos se deben tomar en consideración las condiciones del trabajo y el tipo de manipulación (procedimientos y prácticas de trabajo, cantidad, condiciones de cultivo, etc.), y su incidencia en la posibilidad de exposición del trabajador.

A partir de la evaluación de riesgos se determinarán las medidas de confinamiento y las prácticas adecuadas para trabajar con el cultivo celular.

**Prevención y control**

El trabajo con cultivos celulares implica adoptar buenas prácticas microbiológicas, para proteger al trabajador, al medio ambiente y al cultivo; entre ellas cabe destacar las siguientes:

- Seguimiento de buenas prácticas, especialmente aquellas encaminadas a evitar la contaminación accidental.
- Ante la incertidumbre sobre la posible contaminación de los cultivos que se utilizan por primera vez, se ha de aplicar el principio de precaución, de forma que hasta que no se demuestre que los cultivos están libres de bacterias, virus, micoplasma u hongos se han de manipular siempre dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II. Para reducir esta incertidumbre y partir de cultivos seguros se deben cumplir las siguientes condiciones: 1) emplear líneas celulares bien caracterizadas o bien fuentes controladas de células libres de patógenos (SPF, del inglés: *specified pathogen free*), 2) el uso de medios de cultivo libres de patógenos y 3) la implantación y seguimiento de las medidas de contención adecuadas para minimizar potenciales contaminaciones durante la manipulación de la muestras o en la manipulación de las células (por ejemplo, durante los pasos de realimentación o de lavado).
- Manipular los cultivos celulares procedentes de fuentes mal definidas en locales con un nivel 2 de contención; adoptar niveles superiores de contención en caso de que sea probable que la contaminación se deba a un agente clasificado en un grupo superior.

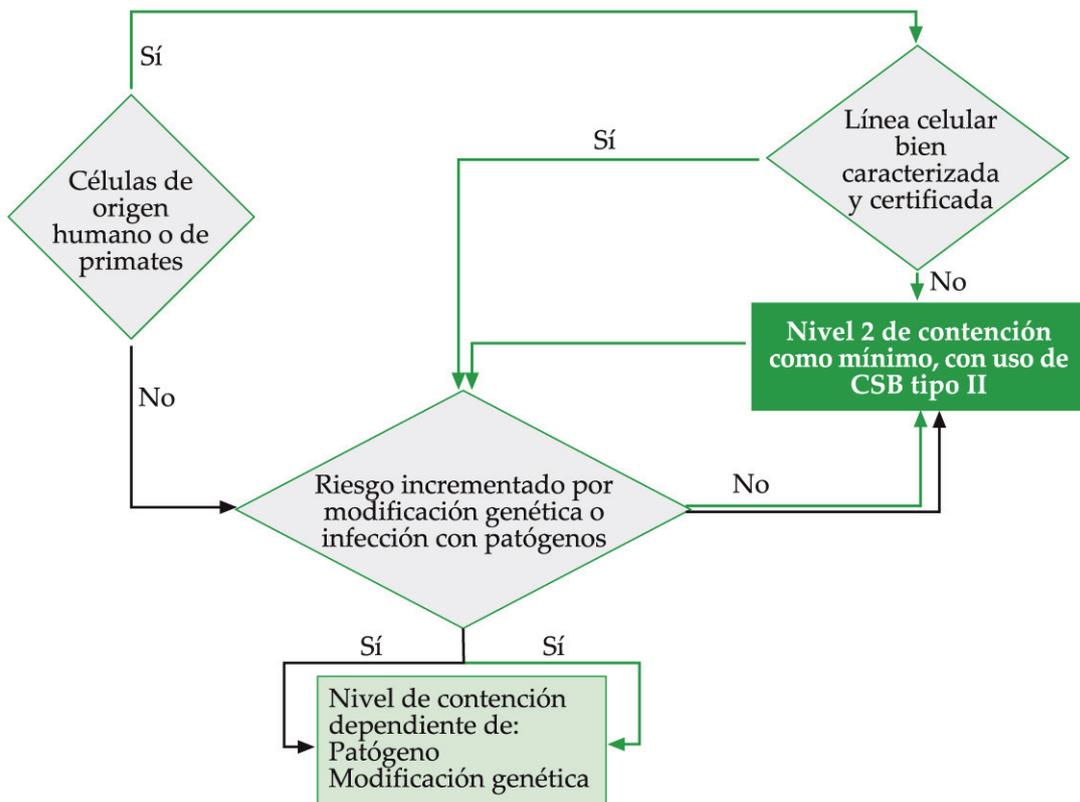


Figura 1. Esquema de aplicación de los niveles de contención.

- Limpiar cualquier derrame del cultivo inmediatamente.
- Si se trabaja con más de una línea celular a la vez, evitar la contaminación cruzada. Limpiar y desinfectar las superficies y útiles de trabajo cada vez que se trabaja con líneas distintas.
- Si es necesario, llevar a cabo un control de calidad de las células que demuestre la ausencia de posibles agentes patógenos contaminantes mediante, por ejemplo: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la detección de la transcripción inversa, los estudios con microscopía electrónica para la observación de las partículas similares a retrovirus, ensayos de infectividad con cultivos de células sensibles o cultivos celulares indicador.

A modo de orientación para la asignación de los niveles de contención, y basándose en lo anteriormente expuesto, en la figura 1 se muestra un diagrama de flujo cuya aplicación es función de las condiciones específicas de cada caso y del resultado de una evaluación exhaustiva de los riesgos.

#### Referencias

- Pauwels, K. et al. *Animal cell cultures: risk assessment and biosafety recommendations*. *Appl Biosafety*, 2007, 12, (1), 26- 38.
- Health Canada. *Laboratory Safety Guidelines*. Health Canada, 3ª ed., 2004.
- INSHT. Notas técnicas de prevención:
  - Mirón, A. NTP 902 Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares.