



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANEXO



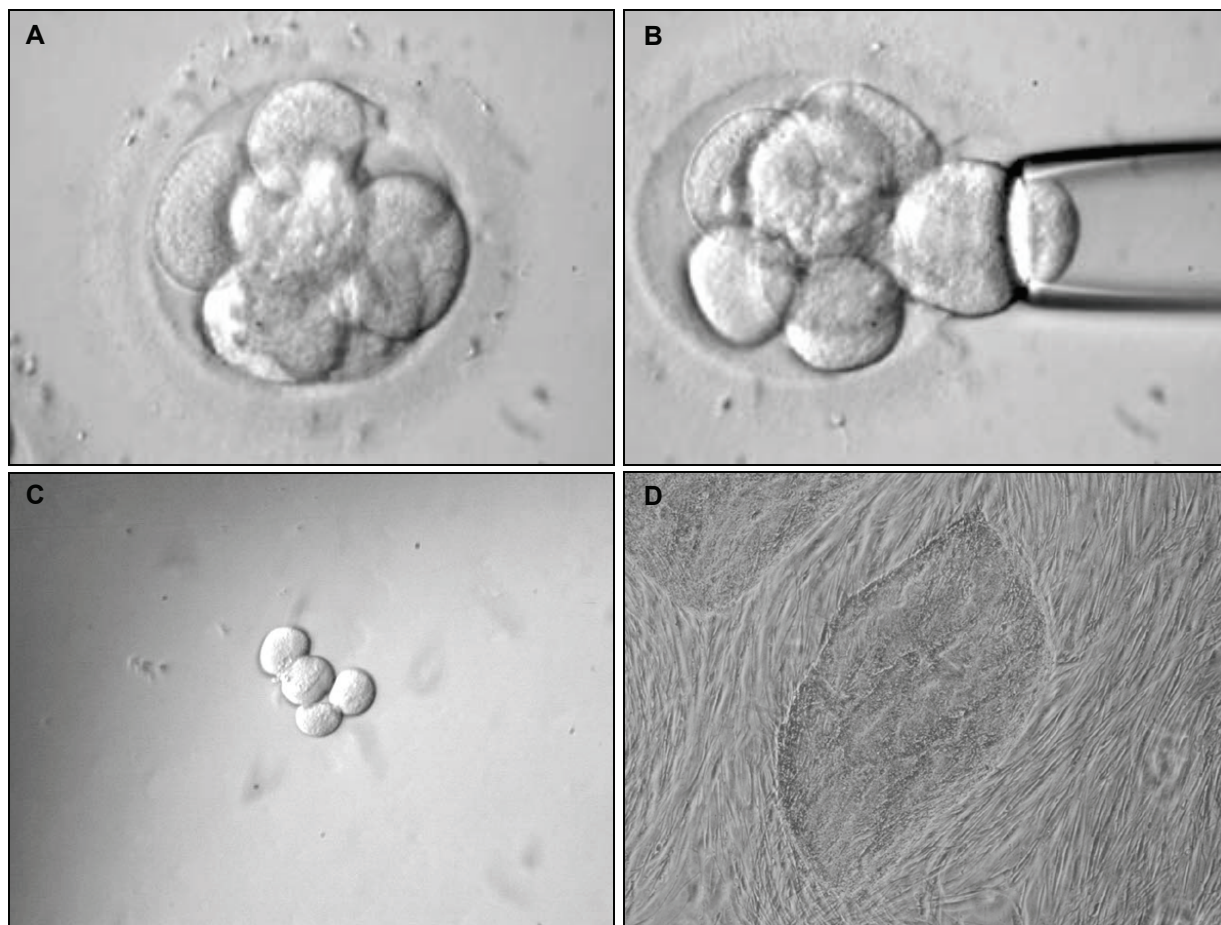
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

MORFOLOGÍA DE VAL-10B

(A) Embrión en estadio de 7 células en día 3 de desarrollo (40x), (B) biopsia de blastómera, (C) blastómera dividida (20x), (D) morfología típica colonias de VAL-10B (4x).





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

TIPIFICACIÓN HLA DE VAL-10B

Llevado a cabo en el pase 6, por el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana.

GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA DE SANITAT

AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Centre de Transfusió de la
Comunitat Valenciana

Doctor
Centro: CENTRO DE INVESTIGACION
PRINCIPE FELIPE

Servicio
LÍNEAS CELULARES (2-15)

Dirección
AVDA. AUTOPISTA DEL SALER, 16-
3
46012 VALENCIA

INFORME DE MUESTRAS EXTERNAS

Paciente - VAL- 10B P6
Nº Pac. 0600306370 (HC:) (SIP:)


Fecha Pet. 16-dic-2008
Nº Toma 60636477
s/ref

HISTOCOMPATIBILIDAD.

TIPAJE HLA CLASE-I POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)

	Eqv. Seroalo	Alelos Amplificados	
Locus HLA - A :	A29(19), A30(19)	A*2902	A*3002
Locus HLA - B :	B44(12), B58(17)	B*4403	B*5801
Locus HLA - Cw :	Cw7,	Cw*0718	Cw*160101

TIPAJE HLA CLASE-II POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE ALTA RESOLUCION (PCR-SSP/SSO)

	Eqv. Seroalo	Alelos Amplificados	
Locus HLA - DRB1:	DR1, DR15(2)	DRB1*0102	DRB1*1501
Locus HLA - DRB3:	.		
Locus HLA - DRB4:	.		
Locus HLA - DRB5:	DR51,	DRB5*010101	
Locus HLA - DQA1:	.	DQA1*0101	DQA1*0102
Locus HLA - DQB1:	DQ5(1), DQ6(1)	DQB1*0501	DQB1*0602
Locus HLA - DPB1:	.	DPB1*0101	DPB1*0401

OBSERVACIONES

Fdo: Dr. José A. Montoro / Dra. Nieves Puig

Valencia, 20 de enero de 2009





Centre de Transfusió de la Comunitat Valenciana - AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Avda. del Cid, 65 Acc - 46014 VALÈNCIA - Tel. 96 386 81 00 - Fax 96 386 81 09



PRINCIPE FELIPE

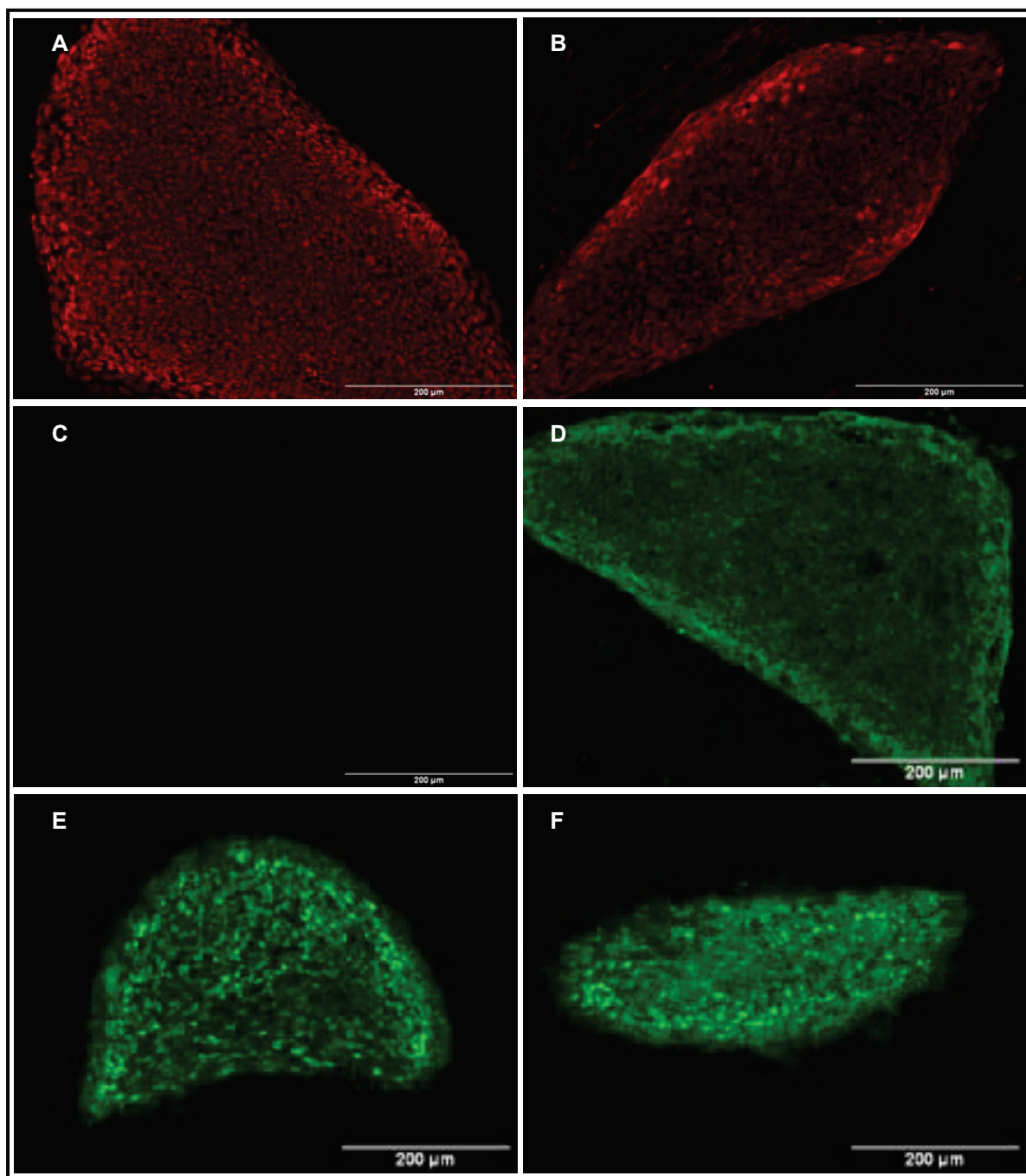
CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

MARCADORES INDIFERENCIACIÓN DE VAL-10B

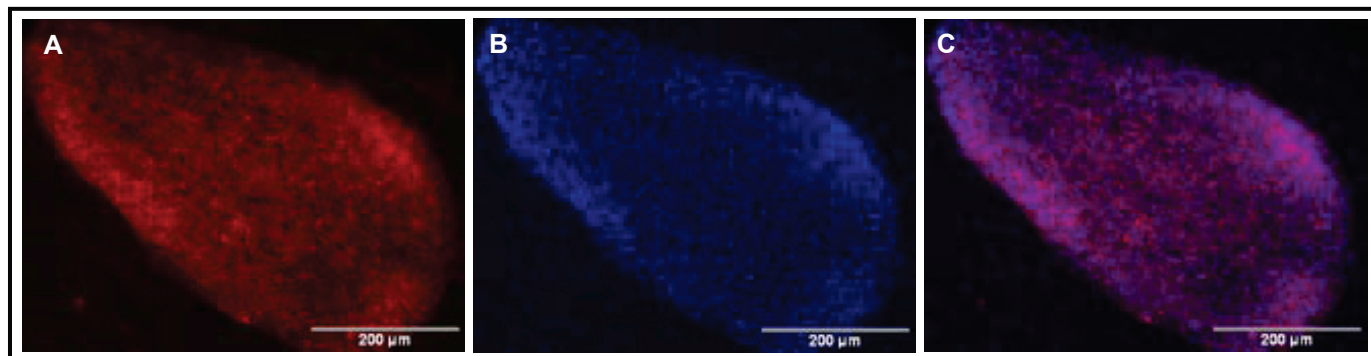
Expresión de antígenos de indiferenciación en VAL-10B

Inmunocitoquímica para OCT-4 (A), Nanog (B) (R&D, Minneapolis, MN), SSEA-1 (C), SSEA-4 (D), Tra-1-60 (E) y Tra-1-81 (F) (Chemicon, Temecula, CA). Barra de escala = 200 μ m.



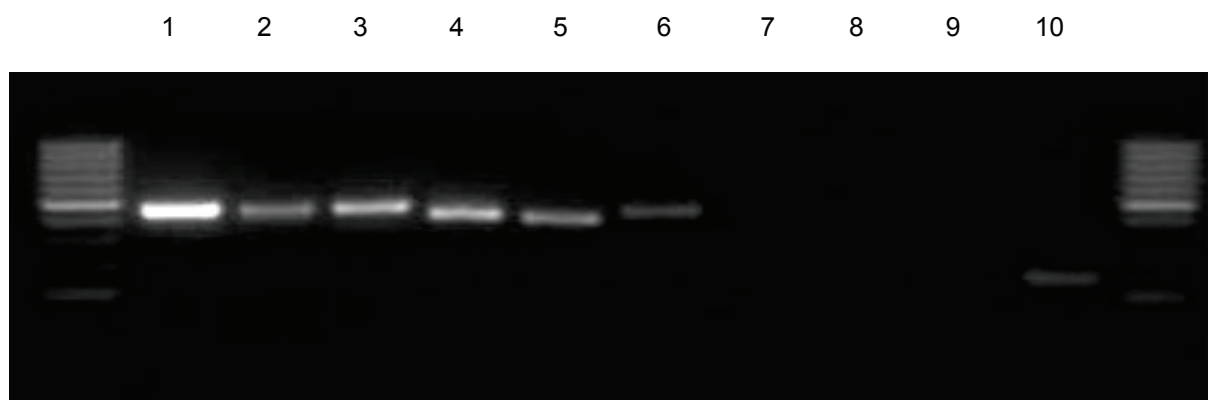
Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina en VAL-10B

Inmunocitoquímica para isoenzima Fosfatasa Alcalina clon TRA 2-54/2J (Chemicon, Temecula, CA) (A) ; DAPI (B); Fosfatasa Alcalina + DAPI (C). Barra de escala = 100 μ m.



Expresión de marcadores moleculares de indiferenciación de VAL-10B

RT-PCR positiva en fase 4 para Oct-3/4 (1), Nanog (2) Cripto (3), Dnmt3 (4), Gabr (5), y Gdf3 (6) y negativa para Nfh (7), Ren (8) y Amy (9). El control interno de expresión utilizado es RPL19 (10).



Determinación de la existencia de actividad telomerasa en VAL-10B

La detección de la actividad telomerasa característica de células inmortales se ha realizado mediante una reacción de PCR utilizando un kit específico (TRAPEZE[®] Telomerase Detection Kit; Chemicon, Australia) y tinción con SYBR[®] (Molecular probes, USA). Se utilizó otra línea de células madre embrionarias humanas como control positivo (1) mientras que el análisis se realizó sobre células intactas de VAL-10B en fase 4 (2). Como controles negativos, se utilizaron células de la línea control inactivadas por calor (3), y fibroblastos (4).





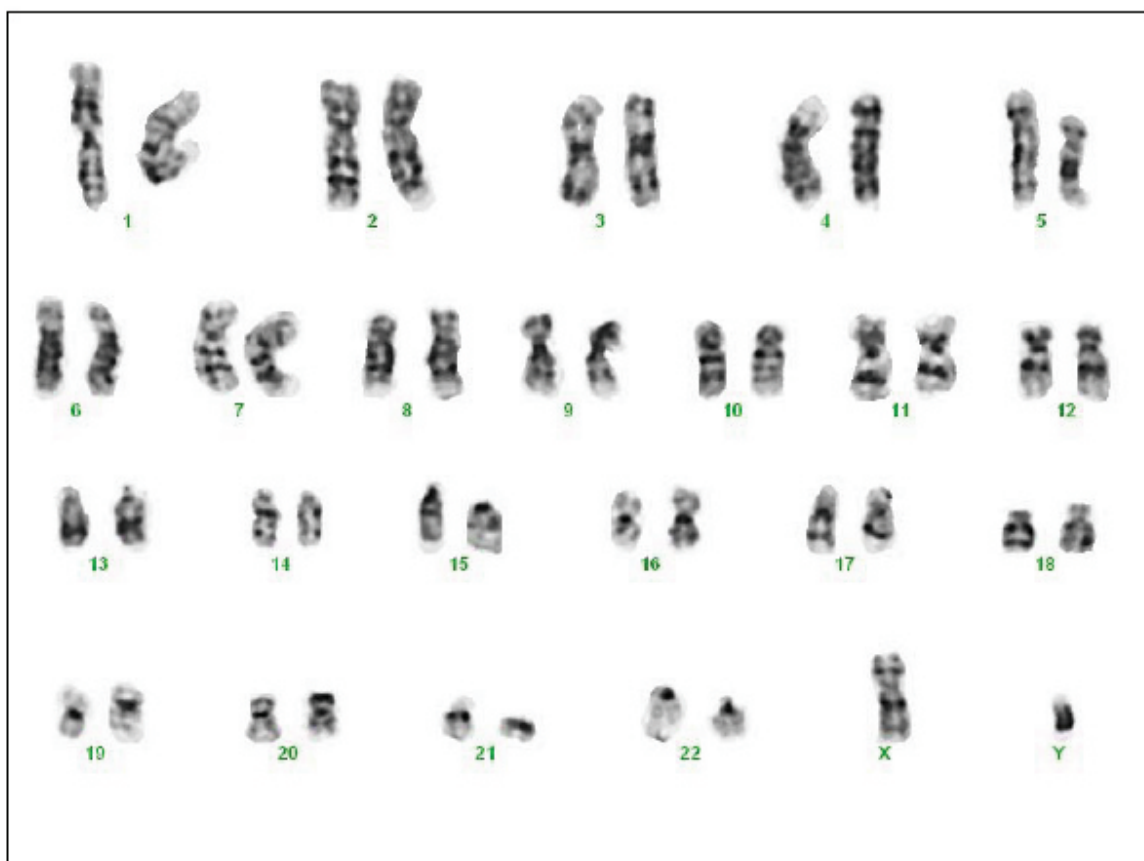
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ESTUDIO DEL CARIOTIPO DE VAL-10B

Llevado a cabo en el pase 6, por un laboratorio independiente (IVI Murcia, España).

INFORME CITOGENÉTICO: VAL-10b

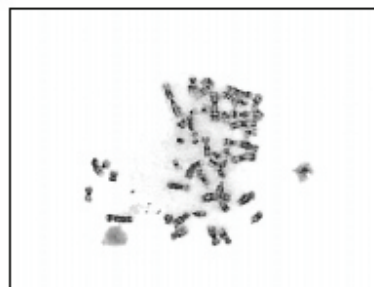


Nombre del caso: VAL-10b

Fecha: 20/01/2009

Nombre del Paciente: Pase 6

Tipo de muestra: Células madres



Resultado: 46,XY [15]

El análisis cromosómico de 15 metafases mediante bandas GTG revela un CARIOTIPO MASCULINO NORMAL.

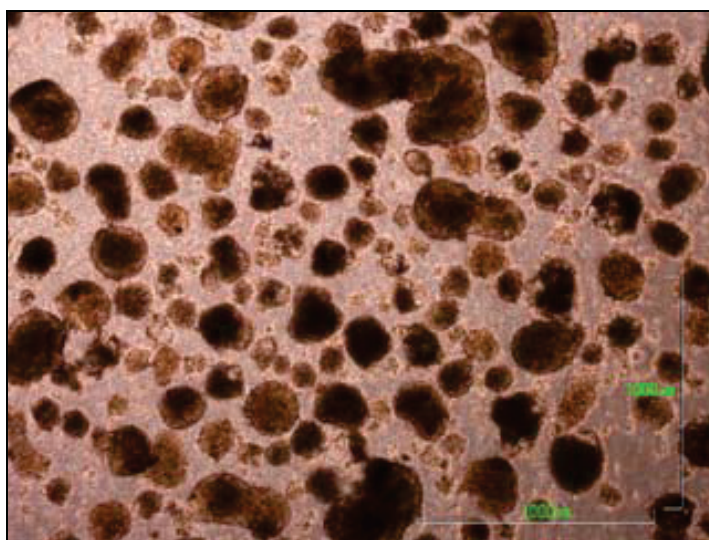
Dra. C. Méndez

Dra. MC Martínez

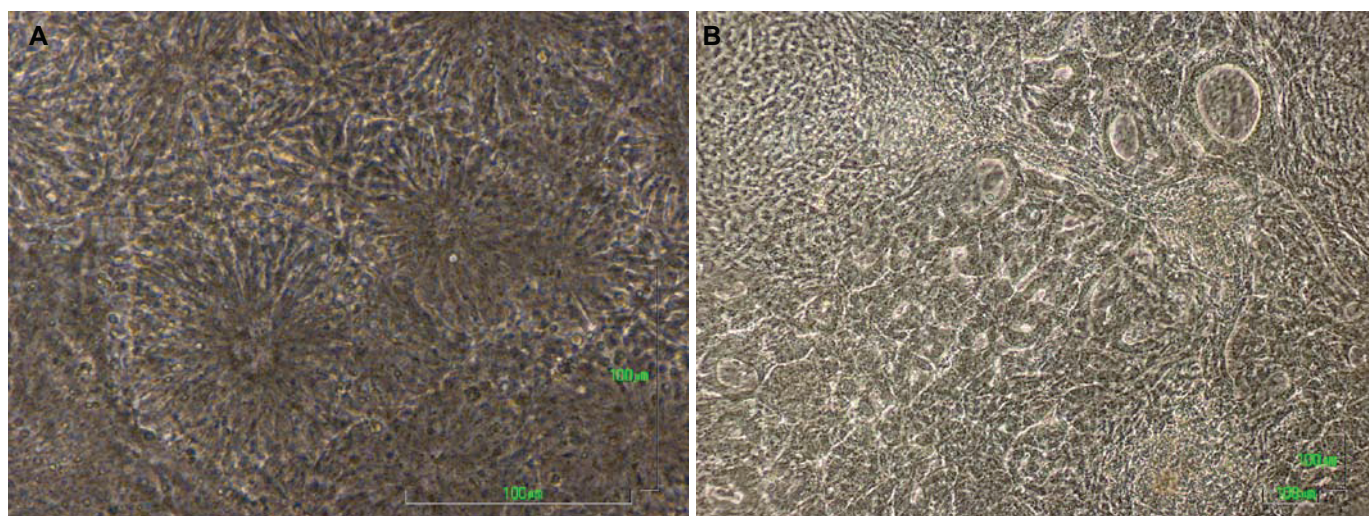
PLURIPOTENCIALIDAD DE VAL-10B

Diferenciación espontánea *in vitro* de VAL-10B

Por flotación, en placas de no adhesión, se generan cuerpos embrioides y se mantienen en esas condiciones entre 4 y 7 días. Barra de escala = 1000 μm .



Transcurrido ese tiempo, los cuerpos embrioides se transfieren a placas cubiertas con gelatina 1% para facilitar su adhesión. Durante el cultivo en placa, se obtuvieron diferentes tipos celulares (A) y (B). Barra escala = 100 μm .

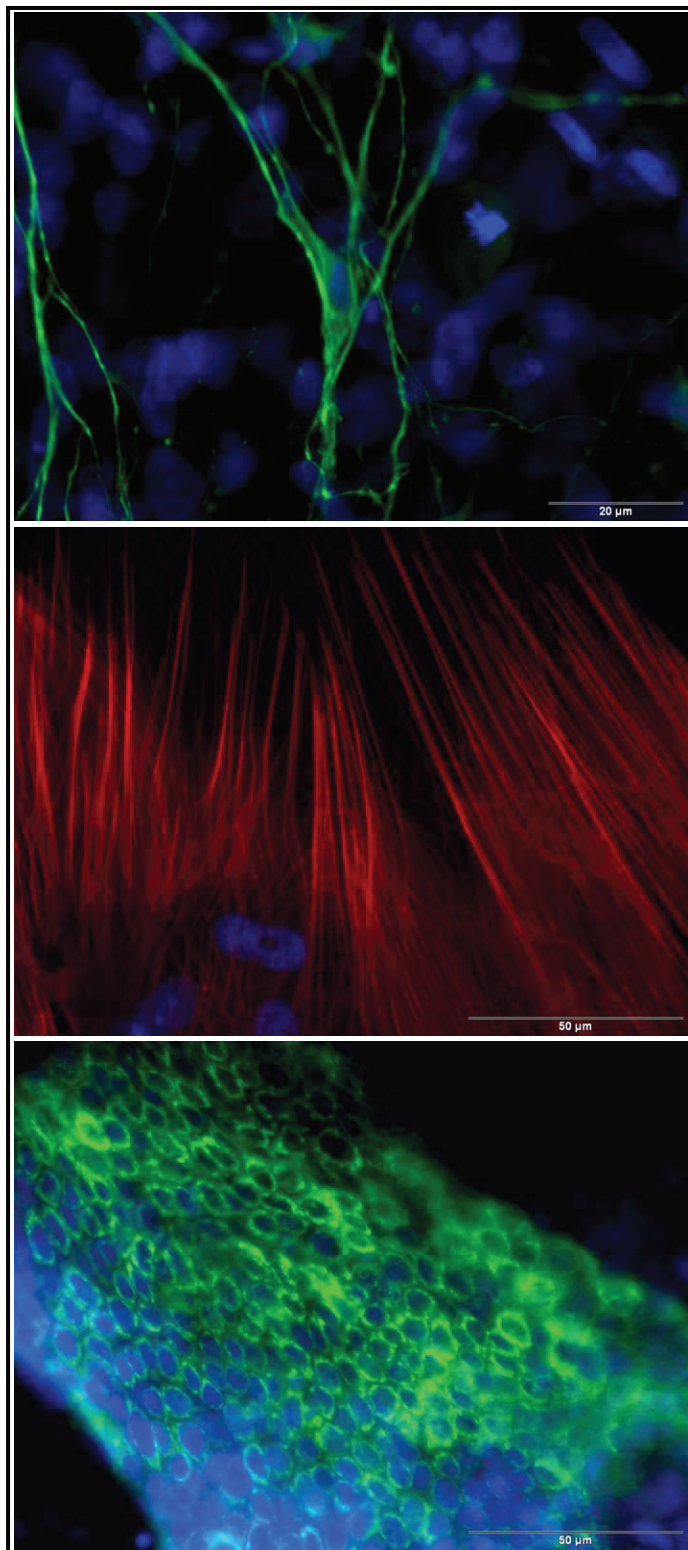




PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Tras 10-14 días, se fijan y se analizan marcadores de diferenciación característicos de (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 20 μ m para (A) y 50 μ m para (B) y (C).





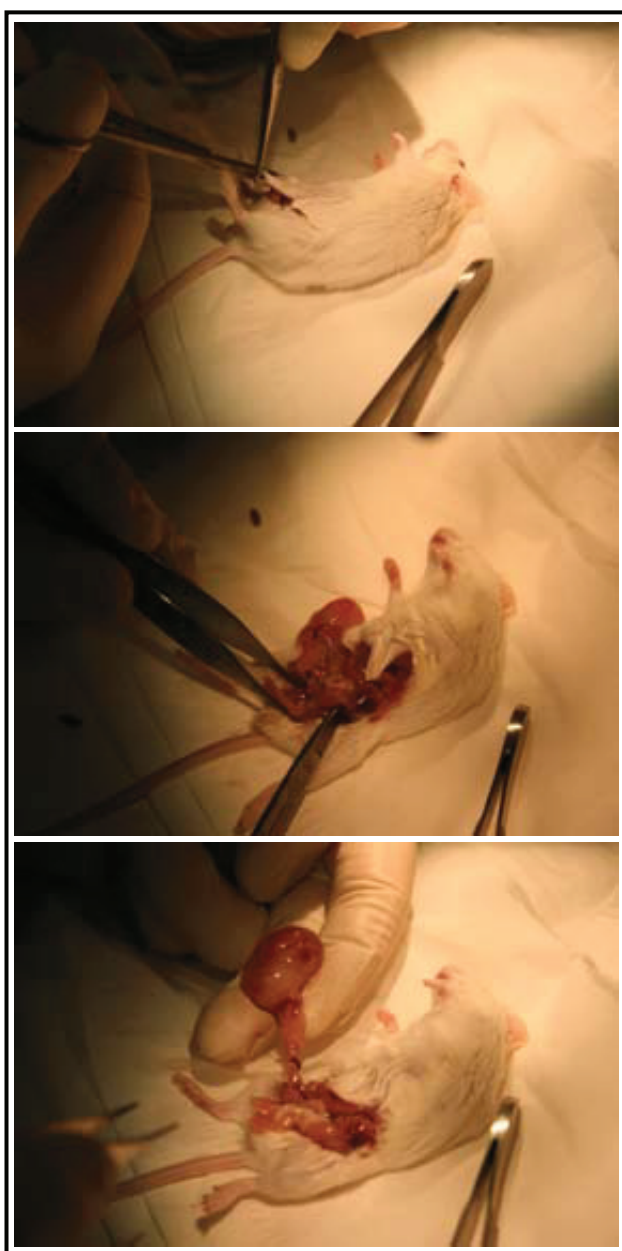
PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Diferenciación espontánea *in vivo* de VAL-10B

Para desarrollar los experimentos de diferenciación *in vivo* de las líneas, se utilizan ratones macho de 8 semanas de edad, con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). Las colonias de células madre utilizadas se aíslan mecánicamente de la monocapa de feeder. Se inyectan 30 colonias por testículo. La aparición de tumores se puede detectar por palpación transcurridas 8 semanas de la inyección. El desarrollo de los mismos se mantiene durante 2-4 semanas más, momento en el que los animales se sacrifican por desnucación cervical.





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Las muestras son fijadas y enviadas para estudio anatomopatológico por parte de un laboratorio independiente (CITOPAT, S.L.).

CITOPAT S.L.
C/. Micer Mascó 7, pta.6
46010 Valencia
Tel. 96-369.09.20

INFORME ANATOMOPATOLÓGICO

<u>PACIENTE</u>	<u>F. Nacim</u>	<u>Nº.H.C.</u>	<u>F. Toma</u>	<u>F. Registro</u>
Sr/Sra: PRINCIPE FELIPE _ , TESTES RATON	10/03/2009		10/03/2009	
Dr/Dra:	Clínica: CIPF			

ÓRGANO: TESTICULO

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

77TI VAL 10B: Testiculo de 1,3 x 1 cm parcialmente quistico y de consistencia gelatinosa.
77TD VAL 10B: Testiculo de 2 x 1,5 x 1,5 cm de consistencia gelatinosa homogenea al corte (dos bloques)
79 VAL 9: Testiculo de 1,5 x 1 cm de aspecto quistico y paredes lisas translucidas con algun area engrosada.
80 VAL 9: Testiculo de 2 x 1,5 x 1 cm de aspecto carnososo y hemorragico

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

DIAGNÓSTICO

77TI VAL10B: TERATOMA QUISTICO CON PREDOMINIO MESENQUIMAL VIENDOSE DIFERENCIACION CONDRA Y AISLADAS AREAS EPITELIALES ESCAMOSAS Y GLANDULARES.
77TD VAL10B TERATOMA QUISTICO CON DIFERENCIACION DE LAS TRES HOJAS EMBRIONARIAS, PREDOMINIO MESENQUIMAL.
79 VAL 9 TERATOMA QUISTICO CON DIFERENCIACION DE LAS TRES HOJAS EMBRIONARIAS CON AREAS DE EPITELIO DIGESTIVO, ESCAMOSO Y MESENQUIMAL CON ALGUN FOCO GLIAL.
80 VAL9: TERATOMA QUISTICO CON PREDOMINIO EPITELIAL.

13/02/2009

Patólogo: Dra. CALABUIG

Página 1 de 2

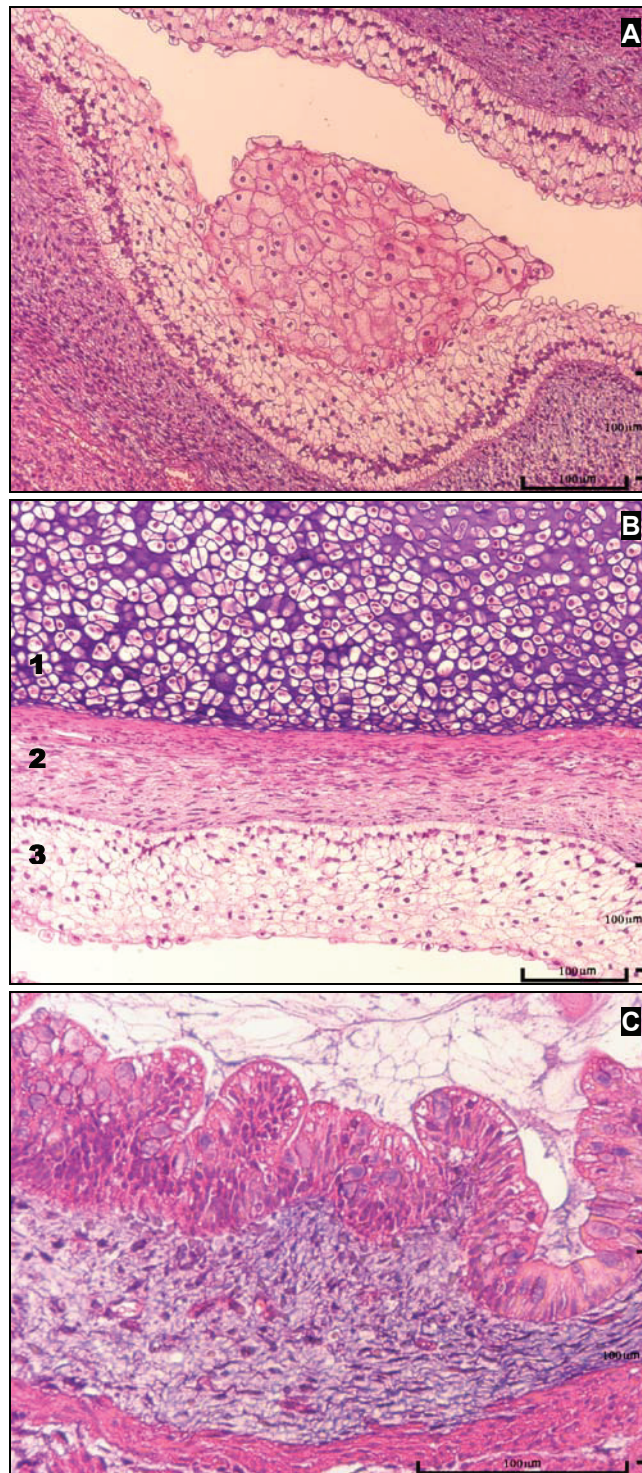


PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Microscópicamente, la búsqueda se orienta hacia la identificación de tejidos fácilmente distinguibles como (A) epitelio escamoso, (B) nido de condrocitos (1) sobre capa de músculo (2) y epitelio (3), o (C) glándulas. Barra de escala = 100 μm .



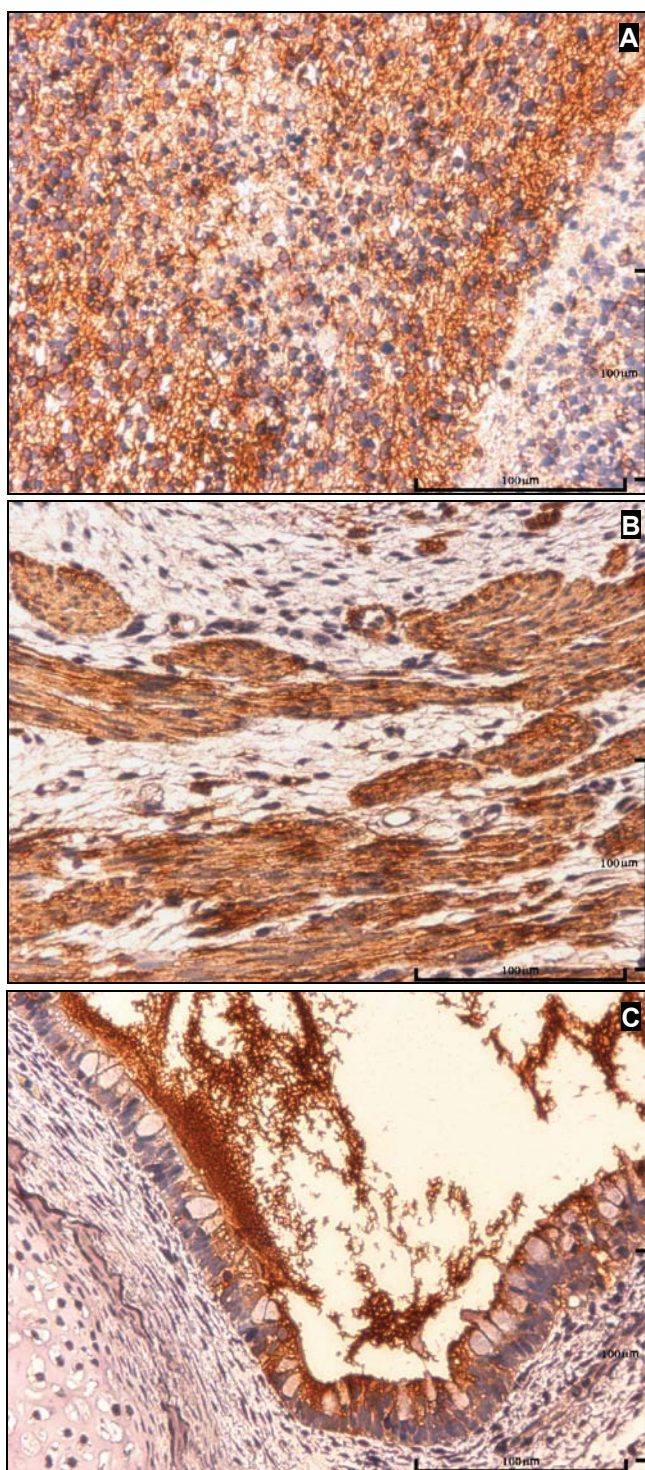


PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

Para confirmar la presencia de derivados de las tres hojas embrionarias, se analizan marcadores de diferenciación característicos de (A) ectodermo (tubulin, β -III), (B) mesodermo (actina muscular) y (C) endodermo (α -fetoproteína). Barra de escala = 100 μ m.





PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE VAL-10B



LABORATORIOS DR. MAQUES, S.L.

C.I.F. B-96853007

Urb. Miravallés, 16.

Teléfono. 96 131 17 20

46111 - ROCAFORT (Valencia)

CIPF-FVIB

BANCO DE LINEAS CELULARES (I-15)

A/A EVA GOMEZ

C/E.P. Avda. Autopista del Saler nº 16-3

(junto Oceanográfico)

46013 (Valencia)

NIF: G 46923421

Nº PEDIDO: 09-I15-0010

MUESTRAS PARA TESTAR
(CIPF 03/02/09)

MUESTRA

RESULTADO

VAL-10 B Pase 17C. bacteriológico: negativo

C. micológico: negativo

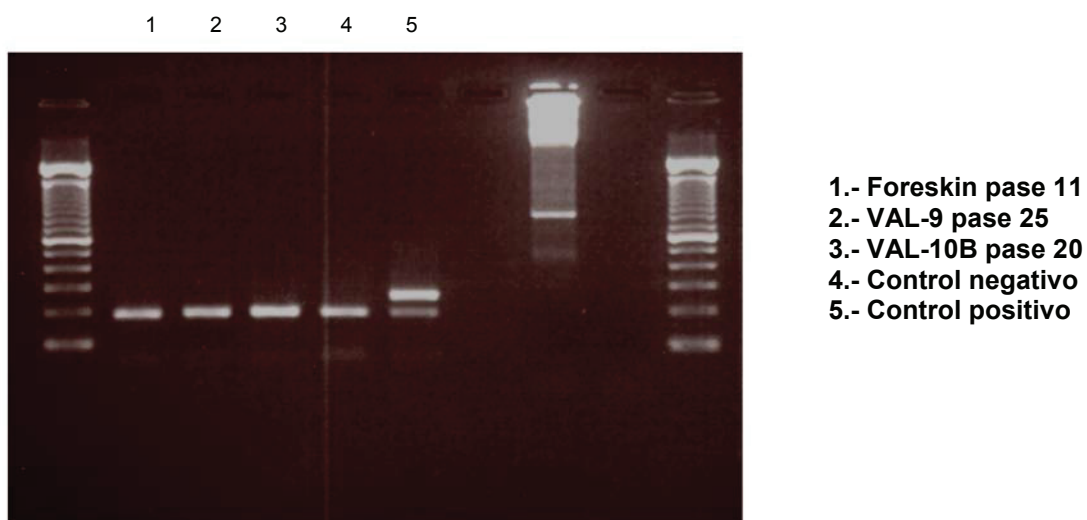
Los medios de cultivo utilizados para la realización de los cultivos bacteriológicos de estas muestras han sido: Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar MacConkey, Agar Sabourand dextrose en Aerobiosis y 10% CO₂ y en medio de Schadler Agar Sangre en Anaerobiosis.

Valencia 9 febrero 2009

LABORATORIOS DR. MAQUES, S.L. inscrita en el Registro Mercantil de la Provincia de Valencia, al Tomo 6.335, Libro 3.640, Folio 1, Sección 8, Hoja V-63.722. Inscripción 1ª.- C.I.F.: B-96853007

El análisis de Mycoplasma se realizó mediante PCR con **Venor® GeM-Mycoplasma Detection Kit**, el cuál cumple con los prerequisites establecidos en la normativa Europea (párrafo 2.6.21) para el test de amplificación de ácidos nucleicos y para el análisis de Mycoplasma (2.6.7 suplemento 5.8).

Venor® GeM- Mycoplasma Detection Kit
Ref: 11-1050, Minerva Biolabs
con *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Ref: 10342-020, Invitrogen)



20-Feb-2009 17:13:48
Exposure = 1.613 secs

Resultado: todas las muestras testadas son negativas para *Mycoplasma*



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA



valid since: 11.06.2008
Rev.: 1.5
page 1 of 18

Validation Report for Venor® GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR

Content:

1	Introduction	1
1.1	Economic Relevance of <i>Mycoplasma</i> Contamination in Biological Systems	1
1.2	Principle of the Venor® GeM Detection Procedure	2
1.3	Relevance of this study	3
2	Base Data of the Study	3
3	Methods	5
3.1	Sample preparation and storage.....	5
3.2	Execution of the Venor® GeM Diagnosis by Minerva Biolabs.....	5
3.3	Analysis of the Test Results.....	5
3.4	Cell-culture enrichment.....	5
3.5	General Reference	6
4	Results	6
4.1	Repeating Precision of Venor® GeM.....	6
4.2	Cut-off limit	7
4.3	Specificity.....	7
4.4	Accuracy comparison with commercial PCR test kits	9
4.5	Robustness	10
4.5.1	Sample matrix variations.....	10
4.5.2	Interlaboratory sensitivity test in sample matrix	10
4.5.3	Investigations to specificity with complex sample matrices	11
4.5.4	Summary of the interlaboratory sensitivity test	12
4.6	Product Stability	13
4.7	Comparison to culture method	13
4.8	Matrix variations with the cell-culture enrichment procedure.....	15
5	Discussion	17
6	Declaration	18



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA



valid since: 11.06.2008
Rev.: 1.5
page 18 of 18

The high specificity of the Venor®GeM was demonstrated by the investigation of numerous species and sample matrices. With very complex matrices, the detection limit decreases in some cases, however mycoplasma contamination can still be proven unique.

The common culture methods for mycoplasma detection, prescribed by the European dispensatory, detect only vital mycoplasma in comparison to the PCR method. The Venor®GeM system however also detects the DNA of dead mycoplasma. In combination with the cell-culture enrichment method only vital mycoplasma are detected. Free DNA from dead and lyzed mycoplasma are rapidly digested by DNases in cell cultures, so that for the PCR method almost the same situation exists regarding the sample conditions, as with the culture method.

The former two major back draws named limited test volume and sensitivity as well as the inability of discriminating viable from dead mycoplasma can be omitted by the cell-culture enrichment method. This method has already been shown by Kong *et al.* [2007, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:223-232]. Our work showed almost similar results using the PCR instead of the a PCR/hybridization technique used by Kong *et al.*

The method worked effectively with a broad range of sample materials, allows a reduction of the test procedure from 28 days down to 5 to 8 days, and can easily be scaled up for testing large sample volumes. Cell-culture enrichment shows also the benefit of a significant reduction of PCR inhibition at the analytical step. None of the sample derived from cell-culture enrichment were inhibiting the PCR. DNA extraction in general is not required and costs drastically reduced.

These investigations demonstrate very good performance parameters for the Venor®GeM Mycoplasma Detections Kits regarding reproducibility, sensitivity and specificity for the confirmation of mycoplasma contamination in biological samples. The test application is fast and simple. The molecular-biological evidence of the pathogen is of an advantage, since the time needed for the investigation of mycoplasma and the expenditure, in the comparison to the culture method, can be strongly reduced. Venor®GeM is suitable by its high sensitivity, particularly for proof of latent mycoplasma contamination in cell cultures as well as a monitoring system for culture setups. Venor®GeM fulfills the prerequisites of a nucleic acid amplification test according to the European dispensatory, paragraph 2.6.21 and for mycoplasma testing according to 2.6.7, supplement 5.8.

6 Declaration

I accept the responsibility for the content of this study and reassure this is a description of the methods employed within the study, and that these results of the process reflect the raw data that was determined.

Dirk Vollenbroich, Ph.D., CEO

Minerva Biolabs GmbH

Berlin - April 18, 2008



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION
BANCO NACIONAL DE LÍNEAS CELULARES
NODO COMUNIDAD VALENCIANA

SOPORTE CELULAR

Ficha técnica y análisis microbiológicos del Feeder utilizado en la derivación y mantenimiento de las líneas:

ATCC Product Information Sheet for CRL-2429

Product: CRL-2429
Lot No.: 5117903

Designation: CCR-11125K Description: Skin fibroblast; Human
Total Cells/ml: 9.0×10^5
Expected Viability: 96% to 97%
Amplify Passage No.: 5
Population Doubling (PDL): 15
Dilute Ampule Content: 1:15 in a T-75 flask
Volume/Ampule: 1 mL
Date Frozen: 09/16/03

A T-75 setup at a dilution of 1:15, using IMDM with 10% FBS, reaches confluence in 7 days.

American Type Culture Collection
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20108-2209

Phone: 800-638-6597 or 703-365-2700
Fax: 703-365-2750 E-mail: sales@atcc.org
Web site: www.atcc.org

Instituto Valenciano de Microbiología

Maria El Romero
Ctra. Bétex - San Antonio de Benagüel, Km. 0.3
46117 Bétex (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivami.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
N° muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar n° 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax.: 963455512

Pruebas de esterilidad de cultivo celular

Tipo de cultivo celular: células FSP13 y medio de cultivo

Muestras preparadas y suministradas por:
Fundación del Instituto Valenciano de Infertilidad

Fecha de recepción: 27 de septiembre de 2004

Prueba de esterilidad para crecimiento de bacterias habituales según norma FDA 21 CFR 610.12.
Muestra: suspensión de 6×10^6 células.
Tiempo de cultivo: 15 días.
Medios de cultivo utilizados: medio líquido de tioglicolato y medio Soybean Casein Digest.
Resultado: Negativo (ausencia de crecimiento bacteriano)

Investigación de Mycoplasma spp.
Muestra: suspensión de 5×10^6 células
Método utilizado: Mycotec.TM con células indicadoras 3T6
Resultado: Negativo (ausencia de Mycoplasma spp.)

Investigación de endotoxinas
Muestra: medio de cultivo libre de células
Método utilizado: Prueba LAL (Limulus Amebocyte Lysate) cromogénica QCL-1000.
Resultado: < 0.1 EU/mL

Investigación de Citomegalovirus
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen Immediate Early-1 (IEA-1)
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de Citomegalovirus)

Registro nacional de Valencia, libro 5053, tomo 2111, sección G, folio 68, hoja n° 9-37131, inscripción 1° - C.I.F. B-8633717

Instituto Valenciano de Microbiología

Maria El Romero
Ctra. Bétex - San Antonio de Benagüel, Km. 0.3
46117 Bétex (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivami.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
N° muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar n° 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax.: 963455512

Investigación de virus de Epstein-Barr
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de proteína de cápside p23 (gen BLP2).
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Epstein-Barr)

Investigación de virus de Hepatitis B
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen HBV precore y gen HBV surface antigen.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de hepatitis B)

Investigación de virus de Hepatitis C
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen de la región NS5B.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de hepatitis C)

Investigación de virus de Herpes humano tipo 6 (variante A)
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes MCP (Major Capsid Protein) y LTP (Large Tegument Protein) y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus Herpes humano tipo 6 variante A)

Investigación de virus de Herpes humano tipo 6 (variante B)
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes MCP (Major Capsid Protein) y LTP (Large Tegument Protein) y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus Herpes humano tipo 6 variante B)

Investigación de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIN-1)
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes gag y pol.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 1)

Registro nacional de Valencia, libro 5053, tomo 2111, sección G, folio 68, hoja n° 9-37131, inscripción 1° - C.I.F. B-8633717

Instituto Valenciano de Microbiología

Maria El Romero
Ctra. Bétex - San Antonio de Benagüel, Km. 0.3
46117 Bétex (Valencia)

Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivami.es
www.ivami.com

Nombre.....: Foreskine - 1
N° muestra.....: 10700001
Referencia.....:
Doctor.....:
Centro.....: Fundación IVI
Dirección.....: C/ Guadassuar n° 1 bajo

Fecha.: 27/09/04
Fax.: 963455512

Investigación de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIN-2)
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células.
Método utilizado: doble PCR con secuencia de los genes pol y env.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus de Inmunodeficiencia humana tipo 2)

Investigación de virus HTLV-1/II
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen tax/rev y posterior secuenciación.
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de virus HTLV-1/II)

Investigación de Parvovirus
Muestra: ADN extraído de 2×10^6 células.
Método utilizado: doble PCR con secuencia del gen VP1-VP2
Resultado: Negativo (ausencia de genoma de Parvovirus)

Investigación de Transcriptasa reversa.
Muestra: Medio libre de células de cultivo en fase exponencial.
Método utilizado: Transcripción reversa con molde de virus Brome Mosaic Virus (BMV).
Resultados: Negativo (ausencia de transcriptasa reversa)

Pdo. Técnicos responsables

Valencia, 22 de octubre 2004
E. Esteban (Dirección técnica)

Registro nacional de Valencia, libro 5053, tomo 2111, sección G, folio 68, hoja n° 9-37131, inscripción 1° - C.I.F. B-8633717