

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 1 de 24

Servei de Cultius Cel·lulars

Normes de funcionament

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 2 de 24

Contingut

Contingut.....	1
1. OBJECTIU:	3
2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:	3
3. INTRODUCCIÓ.....	3
3.1 Què és el cultiu Cel·lular?.....	3
3.2 Servei de Cultius Cel·lulars	3
4. PERSONAL AUTORITZAT	4
5. DESCRIPCIÓ DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS:	4
5. DESCRIPCIÓ DELS CULTIUS CEL·LULARS i DELS LABORATORIS:	4
6. NORMES BÀSIQUES DEL LABORATORI	5
7. INSTRUCCIONS D'ÚS DELS APARELLS:.....	7
8. CONTAMINACIÓ DELS CULTIUS.....	16
9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:	17
10. CONTROL DE Micoplasma:.....	17
11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:.....	18
12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:.....	19
13.1 Exemple de com transportar lentivirus correctament:	22
BIBLIOGRAFIA	23

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 3 de 24

1. OBJECTIU:

Tot el personal que directament o indirecte treballi amb experiments on s'utilitzen cultius cel·lulars *wild type* o transformats de forma estable o temporal (OGM), han de rebre instruccions adequades. Aquestes instruccions inclouran com a mínim, entrenament en tècniques de treball en asèpsia i en la biologia dels organismes que s'usen en els experiments permetent entendre i apreciament els riscos biològics que poden comportar.

L'objectiu d'aquestes directrius són guiar al personal amb les instruccions mencionades, així com saber a qui demanar consell i/o ajuda en cas de necessitat. Donar a conèixer l'estructura i característiques dels laboratoris de l'SCT-CC, les normes bàsiques de treball i d'ús dels aparells, així com les persones responsables a qui dirigir-se en cas d'avaries, contaminacions, accidents o suggeriments.

2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:

Usuaris dels laboratoris de Cultius Cel·lulars de la UdL-IRBLleida.

3. INTRODUCCIÓ

3.1 Què és el cultiu Cel·lular?

El cultiu cel·lular de mamífers és el procés o conjunt de tècniques que permeten el creixement de fragments tissulars de diferents espècies en un ambient artificial "in vitro" per examinar i manipular el comportament cel·lular, mantenint al màxim les seves propietats (fisiològiques, metabòliques, bioquímiques, genètiques ...). Als laboratoris de cultius cel·lulars es treballa amb el cultiu de cèl·lules que poden venir de línies cel·lulars immortalitzades o de cultius primaris (obtinguts de teixits provinents de murins criats a l'estabulari amb aquesta finalitat, teixits humans, etc.).

La característica principal, que defineix el laboratori de cultius cel·lulars, és el **manteniment de l'asèpsia** perquè la taxa de creixement de les cèl·lules en cultiu és molt inferior a la dels contaminants habituals (fongs, llevats i bacteris). Per tant, pel manteniment del cultiu serà vital evitar l'aparició de qualsevol microorganisme no desitjat.

3.2 Servei de Cultius Cel·lulars

El Servei de Cultius cel·lulars (SCT-CC) s'encarrega de vetllar pel bon funcionament dels diferents espais i equipaments destinats al treball amb cultius cel·lulars, així com formar als seus usuaris en bones pràctiques, preservació de l'asèpsia i la **bioseguretat**, assessorar-los en cas de necessitat tant en qüestions tècniques com en el disseny d'alguns experiments.

És un servei adscrit al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques (CMB) de la UdL i dona servei a tots els usuaris dels diferents departaments de la Universitat de Lleida i de l'IRBLleida així com també a usuaris externs.

L'SCT-CC es troba ubicat a l'**edifici de Biomedicina a l'IRBLleida** i compta amb 7 laboratoris de cultius cel·lulars i una zona de crioconservació cel·lular amb tancs de Nitrogen líquid.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 4 de 24

1. **Lab -1.3:** Laboratori de Línies
2. **Lab 1.9:** Laboratori de Línies
3. **Lab 2.9:** Laboratori de Primaris
4. **Lab 2.16:** Laboratori de cultius delicats (stem cells), de llarga durada i lliures de micoplasma i virus.
5. **Lab 3.9:** Laboratori de Primaris
6. **Lab 3.16:** Laboratori de cultius per cultivar cultius de mostres humanes i producció de lentivirus.
7. **Lab 4.11:** Laboratori de dissecció.

4. PERSONAL AUTORITZAT

Al laboratori de cultius cel·lulars només pot entrar el personal autoritzat.

El primer dia d'entrar al servei, els nous usuaris ompliran una fitxa amb les seves dades personals i rebran una explicació de les directrius del servei. Així mateix els nous usuaris hauran d'acreditar haver entès i acceptat el reglament a través d'un petit test. El servei es reserva el dret d'admissió a les instal·lacions en cas de no complir amb la normativa establerta en elles.

4.1. Dades dels responsables:

	Nom	Localització	e-mail	Ext. Tel.
Coordinadora científica	Judit Ribas	Lab. B2.2	judit.ribas@mex.udl.cat	2936
Responsable Tècnic	Marta Rafel	despatx 2.4 Bio. II	mrafel@irblleida.cat	2953 12953
Tècnic superior de suport	Iván Hidalgo	despatx 2.4 Bio. II	ihidalgo@irblleida.cat	2953 12953

5. DESCRIPCIÓ DELS CULTIUS CEL·LULARS I DELS LABORATORIS:

Definició Cultius Primaris i Cultius de Línies

El Cultiu de cèl·lules implica una disgregació cel·lular, ja sigui per mètodes enzimàtics o mecànics. La suspensió cel·lular que s'obté es pot cultivar com una monocapa adherent o en suspensió en el medi de cultiu. El cultiu de cèl·lules permet la seva propagació, augmentant notablement la massa cel·lular del cultiu al llarg de les generacions.

Les cèl·lules que es cultiven directament des de un subjecte es coneixen com a cèl·lules primàries. La major part dels cultius cel·lulars primaris tenen un període de vida limitat, és a dir, al cap d'un cert nombre de divisions les cèl·lules entren en senescència i deixen de dividir-se, generalment mantenint la

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 5 de 24

viabilitat. Ocasionalment, un cultiu primari es manté durant més generacions de les esperades. Aquest fet és degut a la aparició de cèl·lules immortals al cultiu. La raó de la immortalització d'aquestes cèl·lules és, en la major part de les vegades, desconeguda, però es creu que aquesta capacitat està relacionada amb les vies de control cel·lular, és a dir que perquè un cultiu primari s'estableixi com a línia estable està directament relacionat amb la seva variabilitat genètica.

Una línia cel·lular establerta o immortal és la que ha adquirit la capacitat de proliferar indefinidament

5.1. Laboratoris de Primaris: Destinats al treball amb cultius de cèl·lules primàries i cèl·lules de línies contaminades amb micoplasma o no testades.

5.2. Laboratoris de Línies: Destinades al treball amb línies cel·lulars estables lliures de micoplasma.

6. NORMES BÀSIQUES DEL LABORATORI

1. Al laboratori està prohibit menjar, beure, fumar, mastegar xiclet, maquillar-se, manipular lents de contacte i emmagatzemar aliments o begudes.
2. El laboratori es mantindrà ordenat, net i lliure de materials no relacionats amb la feina. No es podrà entrar amb abrics o jaquetes ni amb bosses o motxilles de carrer.
3. Per entrar a les sales de cultius s'ha de portar bata neta de màniga llarga, preferiblement bates exclusives per al treball en el laboratori de cultius cel·lulars.
4. Per entrar a les sala 3.16 l'ús d'una bata exclusiva per la sala és obligatori.
5. Les superfícies de treball es desinfectaran a l'inici i al final de cada ús amb Propano-AF (barreja Isopropanol i EtOH) o "Actril" (tenint en compte les mesures de seguretat, en el cas de tot abocament de material potencialment perillós (medi de cultiu amb cèl·lules humanes, virus...)).
6. Quan es treballa a la campana de flux laminar ruixar amb Propano-AF mans i mànigues.
7. Eviteu la introducció de llibretes, calculadores, caixes de cartró o paper dins de la campana, poden ser font de contaminació.
8. S'han d'utilitzar guants en tots els casos que es manipulin cèl·lules. En el cas de la BioIIA s'utilitzarà doble guant i de nitril preferiblement.
9. Un cop utilitzats es trauran de manera asèptica i a continuació es rentaran les mans. No s'ha de



sortir del laboratori amb els guants posats

Retirada de guantes habitual.mp4

10. No es pot tocar amb els guants de treball posats la resta del laboratori ni el pom de la porta.
11. En acabar de treballar, s'ha de recollir tot el material utilitzat i deixar les campanes buides, netes i desinfectades després del seu ús.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 6 de 24

12. Mentre no es treballi, l'interior de les campanes ha d'estar buit. En el cas de la Bio-II-A únicament es manté a dins el pot d'aspiració, un pot per pipetes llargues i un contenidor groc (per evitar els riscos que comporten els residus d'aquesta campana).
13. Tots els materials, mostres i cultius contaminats hauran de ser descontaminats abans d'eliminar-los. En el cas de cultius que s'han d'eliminar, es neutralitzaran primer amb lleixiu, s'aspirarà el medi neutralitzat i s'eliminarà la placa amb els residus sòlids.
14. **Els residus sòlids contaminats s'aboquen als contenidors negres** (Un a cada campana).
15. Els residus que continguin fàrmacs o substàncies citotòxiques s'aboquen al contenidor blau (un per sala).
16. EL PAPER, PLÀSTIC, POREXPAN, etc. nets i NO CONTAMINATS VAN ALS CONTENIDORS DE RECICLATGE (situats als passadissos).
17. Si el contenidor negre, blau, o groc està ple, qualsevol usuari el pot tancar adequadament i agafar-ne un de buit (dins de la sala). En el cas de residus líquids, primer es neutralitzaran amb lleixiu i seguidament es buidarà el pot a la garrafa de residus citotòxics líquids (al costat de la pica).
18. En el cas de la Bio-II-A, les puntes de les pipetes, pasteurs, agulles, xeringues, etc. es rebutgen al contenidor groc i les pipetes llargues en el recipient amb aigua i sabó per pipetes, que es troben dins de la campana. Tots els líquids s'aspiraran a l'ampolla d'aspiració situada dins de la campana.
19. Un cop finalitzat el treball, el tub d'aspiració s'ha de netejar primer amb lleixiu fins neutralitzar els líquids contaminants o medis de cultiu aspirats (canvi de color de vermell-fenol del medi a transparent) i Propano-AF per eliminar restes de lleixiu del tub. Tancar el buit per evitar l'ús constant de la bomba.
20. No abocar cap líquid brut al bany. Si accidentalment passés, avisar els tècnics del servei. S'haurà de comprovar si s'ha d'inactivar el producte caigut a l'aigua, llençar l'aigua i netejar el bany.

El bany s'ha d'apagar un cop finalitzat el seu ús. És important evitar que quedi encès, es podria cremar la resistència i podria produir un incendi.
21. **Mai s'ha de portar material de Primaris a Línies, ja que podria ser font de contaminació per a les línies cel·lulars.**
22. **En el cas de la creació d'un OMG en una línia humana (línia hs transformada de manera estable a través de lentivirus, CRISPR-CAS, etc.) posar-se en contacte amb el cap de Bioseguretat de l'IRBLleida Eloi Garí i amb la responsable de instal·lacions Marta Rafel.**
23. En les publicacions, Tesis doctorals o treballs finals de Master obtinguts a través de la utilització del servei, s'inclourà una frase als agraïments i es comunicarà al servei. A mode d'exemple: The cell culture experiments were performed in the Cell Culture Scientific & technical Service, Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 7 de 24

7. INSTRUCCIONS D'ÚS DELS APARELLS:

7.1. CABINES DE FLUX LAMINAR:

a. Definició:

Són taules de treball d'acer inoxidable, que els arriba aire de flux laminar prèviament filtrat per filtres HEPA conferint una superfície de treball amb un ambient net i evitant l'entrada de l'aire "brut" turbulent exterior.

La seva funció és la de mantenir una àrea asèptica, lliure de partícules especialment de possibles contaminants (bacteris, llevats...) que poguessin accedir al cultiu.

Segons el tipus de cabina protegirà:

- el personal d'agents nocius.
- el producte dels diferents contaminants.
- el medi ambient (extern a la cabina) de productes de risc biològic

b. Tipus de cabines:

Cabines de flux laminar horitzontal

Les cabines de flux laminar horitzontal són molt adequades per a una bona protecció del producte, però no del manipulador. S'ha de tenir en compte que la distribució del material a la campana de flux horitzontal ha de ser diferent que a la campana de flux vertical, ja que el material de primera línia no queda tan protegit com el que es troba al fons.

Cabines de flux laminar vertical

Les cabines de flux laminar vertical asseguren una bona protecció del producte, i, segons el seu disseny, també una protecció parcial del manipulador al no rebre tot l'aire provinent del producte directament.

Cabines de Bioseguretat IIA

La Cabina de bioseguretat classe II protegeix el producte, el manipulador i el medi ambient. En les de tipus A el 30% de l'aire és eliminat en cada cicle i el 70% recircula. És la més adequada per al treball amb agents patògens particulats de risc 2 (Agents biològics que poden ser causa de malalties humanes i que podrien constituir un perill per als treballadors. Poques vegades produeixen infeccions. És poc probable que es propaguin al col·lectiu i se sol disposar de mesures de profilaxi o tractaments efectius).

* Les campanes de flux laminar no es consideren campanes de bioseguretat. Les campanes de bioseguretat de tipus I són aquelles que protegeixen el manipulador, però no a l'esterilitat del producte (campanes químiques o de fums)

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 8 de 24

		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

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: Cabines de seguretat biològica

Principals riscos biològics

Els cultius cel·lulars no contaminats generalment, no presenten un risc significatiu i la possible inoculació dèrmica origina només una inflamació local. De totes formes, aquests cultius poden contribuir substancialment al risc d'exposició a altres agents biològics que poden actuar com a base o ajudar a la supervivència o a la replicació d'agents oportunistes.

Els cultius de cèl·lules humanes i de primats poden contenir virus patògens entre els quals: Virus de la Hepatitis B i C, VIH, virus de les leucèmies humanes, Virus Epstein-Barr, cytomegalovirus, Herpes simplex 1 i 2... Els cultius de cèl·lules animals no humans o de primats poden contenir Virus Hanta, coriomeningitis linfocítica, virus de la influença, etc. Així com altres paràsits com la toxoplasmosis, etc.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 9 de 24

També les cèl·lules carcinogèniques són font de risc com a resultat de la auto-inoculació accidental del treballador.

Els cultius cel·lulars de major risc són els que procedeixen d'humans i primats, especialment si deriven de sang perifèrica, teixit limfàtic i nerviós.

(Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares. NTP 902. 2011)

Algunes línies humanes presenten un risc especial i es classifiquen en el grup de risc Biològic II. Pel que es recomana mirar les especificacions de bioseguretat en que ha estat classificada cada línia cel·lular, i treballar en acord a aquest.

Per exemple, les cèl·lules HeLa tenen el virus del papiloma integrat al DNA i s'han observat mRNA de la càpside del virus (Xiao *et al.* 2015). En el cas de les 293T, s'ha observat que expressen l'antigen T gran del virus SV40, el qual ajuda a produir partícules lentivirals, convertint-la en una línia de risc 2. A més, s'ha descrit la relació d'aquest antigen i la producció de tumors en cas d'infecció amb aquestes cèl·lules a hamsters i rata, no obstant, en humans hi ha discrepàncies al respecte. Algunes investigacions apunten que podrien produir certs tipus de càncer, mentre que altres consideren que no hi ha suficients dades per confirmar-ho (Xiao *et al.* 2015; Stepanenko & Dmitrenko, 2015; Eddy *et al.* 1961; Eibl *et al.* 1994; Lowe *et al.* 2007).

7.1.1. Normes generals:

Abans de començar a treballar:

1. Reserveu la campana el temps necessari per realitzar l'experiment al registre (P-CC-04) penjat en cadascuna de les campanes encara que no hi hagi altres usuaris que la requereixin (és obligatori reservar el mateix dia, per casos especials parlar prèviament amb el servei).
2. Netegeu i desinfecteu la campana amb el desinfectant adequat:
 - Propano-AF (Barreja d'etanol i isopropanol) Efecte immediat, s'ha de retirar a continuació. No utilitzar a la mampara de metacrilat, ja que aquest no és resistent a l'alcohol i al reaccionar provoca opacitat).
 - Actril (àcid peracètic, peròxid d'hidrogen i àcid acètic) Deixar actuar 10 minuts abans d'assecar. És viricida i esporicida.
2. Col·loqueu tot el material fungible que aneu a utilitzar dins sense apilar, permetent que els UV arribin a tot arreu (prèviament ruixeu el material amb Propano-AF sobretot a la zona de les juntes). ATENCIÓ: els UV de la campana són UVC, d'alta energia, germicides. Eviteu qualsevol contacte amb els ulls i la pell.
3. Enceneu els UV i el flux uns 5-10 minuts abans de començar a treballar.
4. Tanqueu els UV i enceneu el llum per començar a treballar.

Al treballar a la campana:

1. Treballar amb bata i guants (ruixeu les mànigues amb Propano-AF abans de començar).

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 10 de 24

2. Posar tot el material el més centrat possible dins la campana: al treballar s'han de deixar lliures les reixetes de ventilació.
3. No passar mai els braços per sobre de la mostra.
4. Eviteu deixar els taps de les ampolles i tubs a la superfície de la campana (posar-los i treure'ls cada vegada subjectant-los amb la mà). Si cal deixar el tap a la superfície, deixar-lo cap per amunt i lluny de l'àrea de treball, per no passar el braç per sobre.
5. Vigilar de no tocar amb els guants el material estèril que entrarà en contacte amb les cèl·lules. En cas de dubte, descartar el material o identifiqueu la placa per fer-li un seguiment.
6. Obriu el material d'un sol ús dins de la campana. En el cas que material estèril (ex. pipeta) entra en contacte accidentalment amb material no estèril (ex. placa amb cèl·lules), no tornar-lo a introduir dins del medi de cultiu o tampó. És preferible rebutjar la pipeta cada vegada que s'ha finalitzat el seu ús i agafar-ne una de nova (si es torna a necessitar) que deixar-la oberta dins de l'ampolla.
7. Per aspirar líquids, enceneu la bomba d'aspiració i connecteu una pipeta Pasteur al tub (si s'han d'aspirar diferents líquids és bo afegir una punta de pipeta groga i anar canviant-la per no haver de canviar cada vegada la pipeta Pasteur).
8. Tireu el material que ha estat en contacte amb la mostra biològica al contenidor negre / blau de residus.
9. Descarteu la resta de material net (PLÀSTICS; PAPER; CARTRO; POREXPAN) a les papereres de reciclatge.
10. Abans d'eliminar les cèl·lules deixar les plaques 15 minuts en lleixiu diluït al 70%, després aspirar la part líquida i descartar la placa al contenidor negre. No llençar líquids citotòxics per l'aigüera.
11. No traslladar plaques amb cultius d'un laboratori a un altre, excepte per causes majors i permís dels tècnics del servei.

A l'acabar de treballar:

- Recolliu i desinfecteu amb Propano-AF tot el material utilitzat, assegurant que la superfície de la campana queda neta de residus sòlids i líquids, i deixeu la campana buida.
- Tireu la pipeta Pasteur d'aspiració en el contenidor de residus negre / blau i desinfecteu el tub d'aspiració primer amb lleixiu a el 70% i després amb Propano-AF fins que no quedin restes de medi de cultiu en el tub i el dipòsit de residus líquids viri a color neutre (sense color).
- Netegeu la superfície de la cabina i desinfecteu-la amb Propano-AF o Actril (tenint en compte les mesures de seguretat)
- Deixeu els UV funcionant 5-10 minuts (la majoria de campanes es poden programar durant 20 minuts, prement el botó amb la fletxa cap amunt un cop s'hagin encès els UV).

7.1.2. Bio-II-A:

Activitats generals que es realitzen a la campana:

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 11 de 24

- a. Producció de virus.
- b. Infecció de línies cel·lulars o cultius primaris.
- c. Cultius primaris de cèl·lules humanes (potencials transmissors de malalties víriques).
- d. Cultius de línies humanes catalogades amb risc biològic tipus II. Per exemple: Cèl·lules HeLa o 293T.

Normes de treball:

1. Per poder encendre els UV no es pot extreure la tapa frontal.
2. Trebal·leu amb bata de màniga llarga ajustada al canell (o maneguets) i amb doble guant.
3. Tireu el material petit contaminat (puntes, eppendorfs, pipetes Pasteur ...) al contenidor de residus groc situat dins de la campana.
4. Tireu les pipetes llargues en el vas de precipitats amb aigua i sabó que hi ha dins de la campana.
5. Deixeu la resta de material contaminat dins de la campana ruixat amb Propano-AF i amb els UV uns 10 minuts per descontaminar i després tirar-ho al contenidor de residus negre / blau.
6. Els líquids s'han d'aspirar a un recipient i neutralitzar-los amb lleixiu al 70%. Només s'ha de buidar el recipient quan el medi estigui inactivat. Sabrem que les mostres biològiques s'han inactivat utilitzant lleixiu i que l'indicador de pH de color vermell-fenol del medi de cultiu viri, per tant:
 - Líquid blanc-transparent: El medi s'ha basificat, podem descartar el líquid.
 - Medi taronja-rosat: cal afegir més lleixiu. Cal esperar com a mínim 5 minuts per manipular el recipient d'aspiració fora de la campana.
 - Medi vermell-lilós: El medi no s'ha inactivat gens. Cal afegir lleixiu.
 - En cas de manipular líquids que no tinguin indicador de pH o que duguin un colorant, afegirem un 10-20% del Volum a neutralitzar aproximadament.
7. A l'acabar de treballar s'ha de desinfectar amb lleixiu al 70% el tub d'aspiració fins que el líquid del recipient estigui neutralitzat i després afegir-hi Propano-AF perquè no quedin restes de lleixiu al tub.
8. **Per eliminar material biològic viu:** afegir lleixiu al 70%, deixeu actuar la lleixiu durant 10 minuts, aspirar el líquid, destapar la placa i deixar els UV 10 minuts. Finalment elimineu el material i el residu sòlid en el contenidor negre.
9. Les mostres biològiques es poden treure de la campana un cop s'ha lissat o fixat el cultiu. En el cas de fixar les cèl·lules amb productes amb vapors tòxics, es valorarà el risc. Si són cèl·lules de baix risc es traslladarà l'acció de fixar-les en una campana de fums, si pel contrari la mostra *per se* suposa un risc més gran per la salut del treballador es fixaran a la campana, minimitzant l'exposició al reactiu tòxic. Les campanes BIOIIA de l'SCT-CC no disposen de filtres de carbó actiu.

La superfície externa dels tubs, medis, plaques... que continguin les mostres s'han de descontaminar passant un paper amb lleixiu, assecar i posteriorment tractar amb Propano-AF abans de posar-los a les centrífugues o qualsevol altre aparell, o bé, treure-les de la sala.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 12 de 24

10. Treballeu de manera acurada per evitar vessaments i producció d'aerosols. No mantenir les pipetes llargues enganxades al pipetejador a sobre de la superfície de treball per evitar degoteig. Tingueu una precaució especial a l'hora de vortejar i centrifugar tubs i eppendorfs, sobretot si porten substàncies infeccioses. Comproveu que els tubs i EPP estan perfectament ben tancats abans i després de la seva aplicació en centrífugues vòrtex, etc. Les mostres biològiques que continguin virus o fluids humans es centrifugaran a la centrifuga amb tapa anti-aerosols

11. En cas de vessament de medi contaminat:

- Cobriu el medi amb paper absorbent o vermiculita i immediatament neutralitzar-ho amb lleixiu concentrat durant 10-15 minuts. A la sala hi ha un kit de vessaments a disposició de l'usuari amb el protocol d'ús al seu interior.
- Llençar el material absorbent en el contenidor de residus contaminats.
- Desinfecteu la superfície amb Propano-AF i si cal Actril.

12. En cas que es produeixi un vessament al rotor de la centrífuga, espereu una mica abans d'obrir-la per evitar respirar els aerosols produïts i procedir com a la BIO-II-A. Finalment, deixeu el material trencat dins de la campana amb els UV durant 20 minuts.

13. En cas d'accident del manipulador amb un agent biològic de risc:

- Primerament, traieu la roba que s'hagi pogut contaminar. Aquesta es col·locarà en una bossa de plàstic i posteriorment, es rentarà amb lleixiu o depenent de la gravetat es tirarà.
- Netegeu bé la pell o la ferida amb aigua corrent sense fregar.
- Desinfecteu amb etanol al 70%.
- Si es tracta d'una ferida oberta aplicar providona iodada (betadine) i apòsit. Segons la gravetat acudir a urgències del centre hospitalari corresponent.

7.2. Incubadores DE CO₂:

a. Definició:

L'incubador de CO₂ és una càmera que manté els cultius en unes condicions atmosfèriques constants i òptimes per al seu creixement:

- Temperatura de 37°C (temperatura fisiològica de les cèl·lules).
- Concentració de CO₂ (5%) (necessari per a la respiració cel·lular).
- Humitat elevada (per evitar l'evaporació de l'aigua del medi de cultiu).

Per mantenir aquestes constants a l'interior de l'incubador hi ha una safata amb aigua destil·lada i es produeix una recirculació d'aire forçat afavorida pels forats de les prestatgeries.

b. Instruccions d'ús:

1. Les plaques es dipositaran a l'incubador corresponent (primaris, línies, virus) sobre de safates, per facilitar el dipòsit de plaques a les prestatgeries i per evitar vessaments en l'incubador. Les safates són propietat de cada grup. Les safates són obligatòries.
2. S'ha de tenir la precaució de no obrir massa estona la porta de l'incubador per no desestabilitzar les constants atmosfèriques de l'interior. Tanqueu la porta amb cura.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 13 de 24

3. La manipulació de les plaques s'ha de fer amb cura per evitar vessaments agafant de manera que no s'obri la tapa i no perdi l'horitzontalitat.
4. Per evitar contaminacions cal mantenir les prestatgeries netes, i, si hi ha un vessament accidental posar-li paper amb lleixiu, assecar-lo i desinfectar amb Propano-AF. Si es tracta del incubador de virus deixar actuar la lleixiu 15 minuts. Finalment anotar en el full d'incidències.
5. Quan tinguem cultius contaminats haurem de eliminar-los immediatament i anotar-ho al registre de contaminacions de laboratori.
6. Els incubadores es calibren de tant en tant automàticament. Mentre l'incubador s'està calibrant NO es pot obrir la porta ja que el desestabilitzariem. Esperarem que l'incubador torni al seu estat de repòs.

7.3. MICROSCOPIS I LUPES

1. Netejar els oculars amb paper i Propano-AF i la platina on dipositem la placa a observar, així evitarem problemes de contagi de contaminacions entre usuaris i de les cèl·lules.
2. Col·loqueu la mostra a la platina, posar els augments necessaris i enfocar per a visualitzar les cèl·lules.
3. Si hi ha qualsevol funció que no es conegui no ha de manipular, cal demanar assessorament prèviament. Si es detecta algun mal funcionament, aviseu a el personal del servei.
4. Recordeu de tancar la llum de microscopis i lupes a l'acabar de treballar.
5. Al laboratori 1.9 i 2.16-3.16 tapeu els microscopis i lupes si creieu que sou l'últim usuari que va a treballar. A la nit s'encenen els UV a la sala i cal protegir-los.

7.3.1 Microscopis de contrast de fases invertits:

a. Definició:

Permeten fer el control morfològic de les cèl·lules vives dins el recipient de cultiu.

El fet que les mostres a observar es troben en recipients gruixuts fa que un microscopi convencional no sigui capaç d'enfocar i observar les cèl·lules, per la qual cosa s'han desenvolupat microscopis en què la font d'il·luminació i els objectius es troben invertits respecte a la platina d'un microscopi òptic convencional.

La segona característica que condiciona l'instrument òptic és l'absència de color de la mostra per què es tracta de cèl·lules vives que tenen poc contrast i no es poden tenyir sense danyar-les. Per pal·liar-ho, el microscopi s'equipa amb el dispositiu de contrast de fases, així el contrast de la imatge augmenta i la qualitat obtinguda és molt superior.

7.3.2 Microscopis invertits o lupes de fluorescència:

a. Definició:

Són microscopis o lupes com els anteriors però que compten amb un llum que emet llum a diferents longituds d'ona permetent visualitzar imatges que tenen fluorescència o que estan marcats amb fluorocroms.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 14 de 24

Tenen una càmera acoblada i connectada a un ordinador per a la captació d'imatges per documentar l'estat dels cultius.

b. Instruccions d'ús:

- En els microscopis dels laboratoris 3.16 i 3.9, per allargar la vida de la bombeta de fluorescència de mercuri, un cop encesa no es pot tancar fins passats 15 minuts; i un cop desconnectada no es tornarà a encendre fins després de 10 minuts.
- Per a la gestió del manteniment del llum de fluorescència del microscopi hi ha uns registres de temps d'utilització (P-CC-07) que han de ser omplerts pels usuaris.
- Seguir les instruccions de l'equip.

7.3.3 Lupes de dissecció

a. Definició:

Estereomicroscopis que augmenten fins a 10 vegades la mostra per facilitar la dissecció de teixits. S'utilitzen en els laboratoris de cultius primaris.

b. Instruccions d'ús:

- Netejar els oculars amb paper i Propano-AF i la platina on dipositem la placa a observar, així evitarem problemes de contagi de contaminacions entre usuaris i de les cèl·lules.
- Posar la mostra sobre la platina i enfocar per fer la dissecció.
- Durant la dissecció s'ha de vigilar amb el material punxant, i si es produeix un tall netejar la ferida amb aigua i sabó i aplicar betadine i un apòsit.

7.4 CENTRÍFUGUES:

a. Definició:

Al laboratori de cultius es necessita una centrífuga per la precipitació de les cèl·lules en suspensió, obtenció de tipus cel·lulars per gradients, concentració de buffers o virus, etc.

b. Instruccions d'ús:

- Poseu el tub o la placa dins de l'adaptador del rotor i contrapeseu amb el mateix volum en la posició simètrica de la banda oposada.
- Trieu el programa adequat i posar en marxa l'aparell.
- Si es produeix el trencament d'un tub dins de la centrífuga: abans d'obrir-espereu que es dipositin els aerosols que s'hagin pogut formar, desinfecteu amb un paper amb lleixiu i seguidament amb etanol. Si es tracta de virus o agents Biològic de risc 2, deixeu actuar el lleixiu uns 15 minuts dins la BioIIA.

i) Centrifuga amb tapa anti-aerosols (sala 3.16)

- Traieu els adaptadors a utilitzar de la centrífuga i porteu-los a la campana BioIIA.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 15 de 24

- Col·loqueu els tubs ben tancats
- Tanqueu l'adaptador amb la tapa anti-aerosol i procediu com en l'apartat 7.4b
- Un cop centrifugat, torneu a prendre l'adaptador dins la BioIIA per extreure'n els tubs i comproveu que no s'hagi produït cap vessament a l'interior.

7.5 BANYS:

a. Definició:

Cubetes amb capçal termostàtic per escalfar els medis de cultiu, sèrum i altres substàncies en un bany humit. El capçal està programat perquè l'aigua arribi a una temperatura de 37°C i es mantingui. Mitjançant un sistema d'impulsió d'aigua s'aconsegueix homogeneïtzar la temperatura a tot el bany.

b. Instruccions d'ús:

- Omplir el bany amb aigua destil·lada fins que cobreixi la resistència (alguns banys es bloquegen si no hi ha prou aigua i abans de tornar a posar-los en marxa cal fer-los un reset).
- Connecteu el capçal (trigarà aproximadament 15 minuts en arribar a la temperatura de 37°C).
- Els tubs i ampolles a introduir al bany han d'estar ben subjectes, sigui amb flotadors, gradetes o amb pesos, per evitar bolcades i contaminació de l'aigua de bany i de el producte.
- Quan no hi hagi ampolles ni tubs dins el bany, apagueu el capçal.
- En cas de vessament d'algun reactiu / cèl·lules al bany s'avisarà al personal tècnic per a procedir amb la descontaminació del mateix.

7.6 TANC DE N₂ LÍQUID (-196°C) *(més informació al PNT-CC-18)*:

a. Definició:

Tanc que conté N₂ líquid que té un alt poder frigorífic (-196°C) i s'utilitza per emmagatzemar les línies cel·lulars.

b. Instruccions d'ús:

- S'ha de manipular amb guants i és convenient protegir els ulls i portar sabates tapats per protegir els peus de possibles esquixades ja que el contacte directe amb la pell produeix cremades.
- Cada grup té assignades unes caixes i controla els seus vials.
- Abans d'obrir la tapa, cal saber en quin rack es troba el vial que us interessa per evitar una evaporació excessiva, de N₂, ja que a més desplaça l'oxigen. Els tancs es troben en una sala amb accés restringit. Els tancs estan tancats amb clau pel el que es baixarà acompanyat d'un tècnic del servei.
- S'ha de tenir en compte que el Nitrogen desplaça l'oxigen per la qual cosa ha d'estar a una certa distància del tanc en cas d'evaporació llarga, p.ex. per omplir dewars o altres tancs.

c. Accidents i seguretat:

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 16 de 24

En cas d'emergència per vessament de Nitrogen Líquid, si hi ha zones de el cos cremades actuar segons la gravetat de l'afectat, trucar 112 o dirigir-se a la mútua en acord a el tipus de contracte que és té (veure capítol 12).

d. Bioseguretat:

En cas de trencament d'un vial cel·lular transformat, el recollirem amb guants mentre segueixi congelat, introduir-lo en un tub de tancament hermètic o neutralitzar-lo amb lleixiu, i rebutjar a un contenidor de residu biològic. En cas que el tub ja estigui descongelat i es produeixi un vessament d'agents biològics actuarem seguint el protocol d'abocaments PNT-CC-19.

7.7 CAMBRA D' HIPÒXIA

La càmera d'hipòxia és una cabina de cultiu cel·lular tancada hermèticament que permet el control i la regulació de la concentració d'oxigen, CO₂, temperatura i humitat. Tenen la característica que les mostres es poden introduir, manipular, incubar, examinar i treure sense perdre les condicions ambientals preestablertes. Abans d'usar-per primera vegada, contacteu amb els tècnics del servei.

8. CONTAMINACIÓ DELS CULTIUS

Una de les principals fonts de contaminació en el laboratori de cultius cel·lulars és el propi individu.

En els laboratoris de cultius cel·lulars és impossible treballar completament sense gèrmens, però es pot reduir la densitat tenint en compte la font d'aquestes contaminacions.

Sovint els cultius es contaminen amb microorganismes procedents de les mans, la boca, cara, o roba, és per això que és de vital importància la utilització de guants, bata llarga i rentar-se les mans cada vegada que es treballa, així com l'ús de substàncies desinfectants com ara l'etanol.

Posar-se una bata neta abans d'entrar en una sala de cultius o unes sabates diferents als d'ús diari ajuden a reduir en gran mesura el nombre de gèrmens presents a la sala. Així com evitar roba de llana o similars per treballar en les campanes ja que són font de contaminació.

→ És per això que, cal portar bata neta (si pot ser només per a la sala de cultius millor), treballar amb guants estèrils i evitar tot contacte amb el material que hagi d'entrar en contacte amb el cultiu. Evitar passar la mà o el braç per sobre de qualsevol material obert, ja siguin plaques, puntes, tubs, medis etc. continguin o no el cultiu i treballeu a la part central de la campana.

Per la mateixa raó, un cop s'està treballant en la campana no s'ha de respondre a el telèfon, tocar poms de les portes amb els guants, ni gratar els cabells, nas etc. sense abans canviar-se de guants, rentar-se les mans o desinfectar-los.

La superfície de la campana ha d'estar lliure d'aglomeració de material. Per això hem d'evitar entrar caixes de cartró etc. i procurar que el flux d'aire i la llum ultraviolada pugui passar entre tots els objectes presents a la campana.

Una altra font de contaminació poden ser els aerosols que es poden produir.

- Per això ha d'evitar-se:

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 17 de 24

- Utilitzar el mateix medi, PBS, tripsina, etc. per a diferents tipus cel·lulars.

-Treballar en paral·lel amb més d'una línia cel·lular en la campana.

-Treballar amb material no estèril o contaminat.

-Quan es retirin els medis i altres productes del bany per usar-los en la campana és molt important assecar-los bé i passar Propano-AF per tota la superfície de l'ampolla / tub abans de ficar-los a la campana.

Exterior de les plaques que contenen el cultiu és estèril al principi, però en el moment que les traïem de la campana i les movem a l'incubador, les hem de mantenir netes al màxim:

- Tocar les plaques amb guants o les mans ben netes i etanolitzadas. Dipositeu les plaques sobre una safata a l'interior de l'incubador. Quan les mireu al microscopi, hem d'assegurar que la platina està desinfectada i neta. Finalment agafar les plaques amb delicadesa (evitant moviments que puguin vessar el medi o fer que entri en contacte amb la tapa), però amb fermesa a el mateix temps per assegurar-nos que la tapa no s'obre de forma accidental fora de la campana.
- És molt important no oblidar cultius antics a l'incubador, acabessin contaminats i són una font de perill per als altres usuaris.
- En cas d'estar constipat es recomana l'ús de mascareta per evitar contaminar les superfícies de la sala i els cultius al manejar-los.
- Si dubtem d'un medi contaminat, analitzar una alíquota de medi incubat a la sala d'incubadores per bacteris per no posar en risc altres usuaris. En el cas que el dubte sigui d'un cultiu i l'experiment és molt important, se li canviarà el medi amb un nou i es pujarà la dosi o es canviarà d'antibiòtic.

9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:

- Si es contamina un cultiu cel·lular, anotar-ho al registre de contaminacions (P-CC-10).
- Elimineu el cultiu:
 - Afegir lleixiu 70% a la placa.
 - Deixar actuar 10 min.
 - Aspirar el líquid.
 - Llençar la placa al contenidor de residus negre.

10. CONTROL DE Micoplasma:

- El micoplasma és un bacteri que pertany a la família dels Mollicutes que inclou més de 180 espècies diferents, però en cultius cel·lulars el 95% d'aquestes són, *M. orale*, *M. arginii*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hyorhinis* i *A. laidlawii*. És l'organisme que s'autoreplica més petit amb una mesura d'entre 0.2-0.8µm. No té paret cel·lular i acostuma a estar enganxat a la superfície de la membrana cel·lular d'altres organismes aprofitant-se dels seus hostes per absorbir nutrients. En la naturalesa es troba com a paràsit en els humans, mamífers, rèptils, insectes i plantes.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 18 de 24

- El micoplasma creix a poc a poc, no mata les cèl·lules, però afecta diferents paràmetres cel·lulars com un augment a la sensibilitat d'inductors d'apoptosi, aberracions cromosòmiques, disrupció de la síntesi de DNA, alteracions en l'eficiència de les transfeccions, inhibició del creixement cel·lular, etc.

Per tal de garantir que les sales de línies es trobin lliures de Micoplasma, es realitzen controls periòdics en els quals es testen les línies amb què treballen els usuaris. Per poder dur-los a terme els usuaris han de facilitar-nos les mostres seguint aquest protocol:

- Recollir 500ul -1ml de sobrenedant de cultius cel·lulars en un eppendorf que hagi pogut estar al menys 48h en contacte amb les cèl·lules (preferiblement 72h). No s'acceptaran mostres infectades amb virus. Controleu que els tubs estiguin ben marcats per l'usuari.
- Omplir el full de sol·licitud (P-CC-2) i lliurat via correu electrònic o descarregat de la pàg. Web de l'IRBLleida (<https://www.irblleida.org/ca/serveis-cientifico-tecnics/cultius-celulars/>). I fer arribar a través de correu electrònic:
 - nom línia
 - tipus cel·lular
 - Origen (estocs, manteniment, ...)
 - Nom de la persona i grup
 - Data de recollida
- L'anàlisi per PCR es realitzarà un cop per setmana.
- El resultat es farà saber via e-mail. Si el resultat és positiu i en cas que l'usuari no opti per destruir les cèl·lules, els tècnics de l'SCC estan autoritzats per exigir el trasllat de la línia cel·lular a la sala adequada de primaris.

11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:

- Si passa qualsevol incidència, anotar-la en el registre d'incidències (P-CC-09), enviar un correu electrònic o trucar a el telèfon d'incidències 12953 o 664.340.756.
- Si es tracta d'una incidència de resolució urgent, comunicar directament als tècnics de laboratori o la responsable de l'SCT via ext. telefònica o via telèfon d'incidències 12953 o 664.340.756.
- Els tècnics de laboratori prendran les mesures oportunes i faran un seguiment de la resolució.
- Si et trobes sol en aquest moment, mira si hi ha alguna actuació que poguessis fer que evitaria danys majors, p.ex. si un incubador s'espalla, moure totes les plaques de tots els usuaris d'aquest incubador a un que funcioni correctament.
- En cas de fallada de l'electricitat de la sala o de l'edifici, aviseu a un tècnic de l'SCT o comprovar els diferencials de la sala (en general quadre a la banda de la pica) i si no s'arregla fer una incidència urgent a l'OTI via web <http://www.udl.cat/ca/serveis/oti/formulari/salut/> o en persona si és possible. En aquest cas segellar TOTS els incubadores de l'edifici per minimitzar la pèrdua de T^a i de CO₂.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 19 de 24

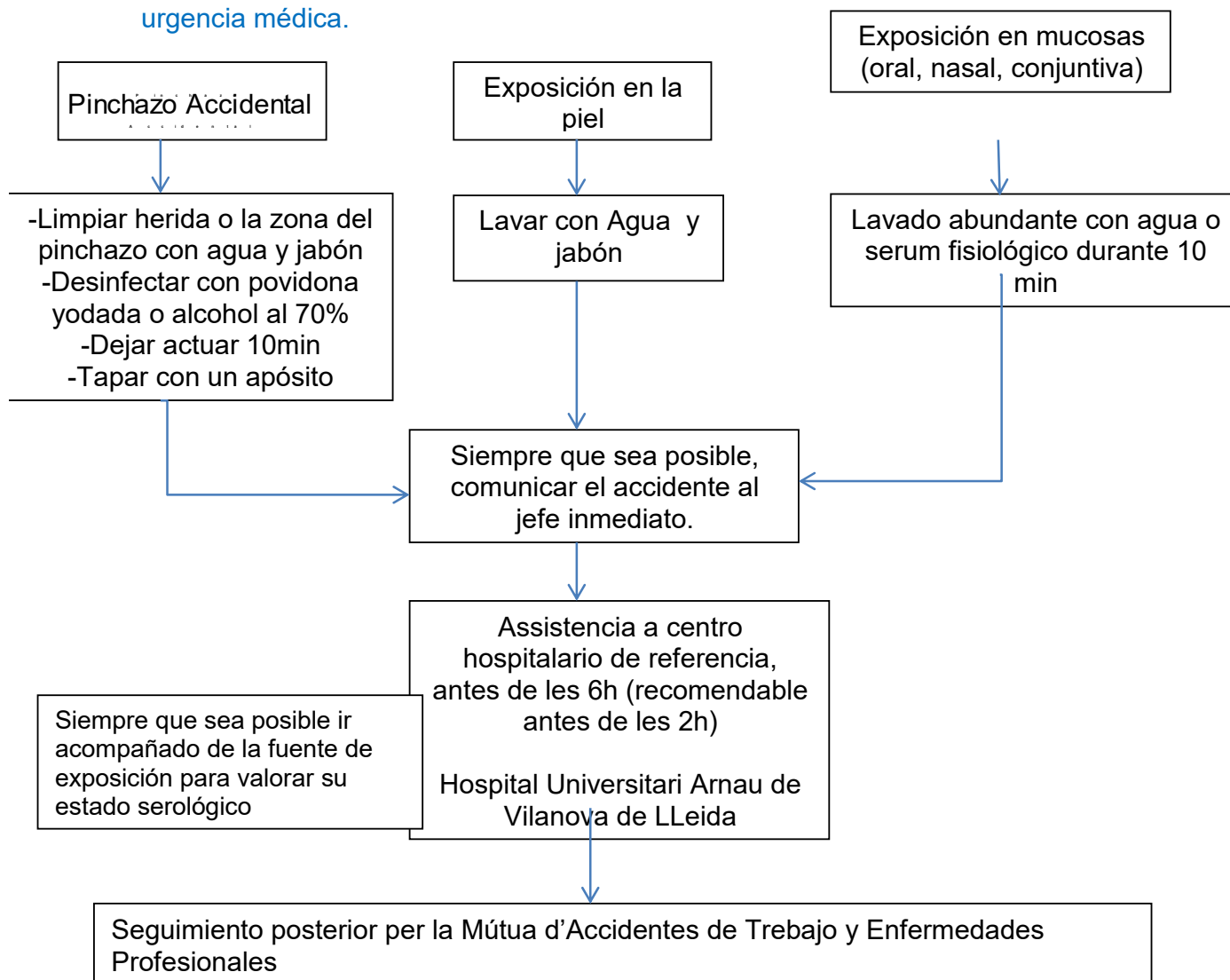
12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:

- **NORMA GENERAL:** La majoria dels agents de risc manipulats (VHB, VIH, micoplasma) s'inactiven amb lleixiu (hipoclorit sòdic). A més, en funció de l'agent també s'inactiven amb alcohol o sabó. En conseqüència:
- **SOBRE SUPERFÍCIES:** aplicar lleixiu, deixar actuar uns 10-15 min. i assecar amb paper de filtre que es tirarà al contenidor de bioseguretat (blau), després desinfectar amb etanol a l'70%.
- **SOBRE LA PELL, ROBA O SUPERFÍCIES NO RESISTENTS:**
 - Primer treure la roba.
 - Rentar amb aigua corrent sense fregar la pell.
 - Aplicar sabó de mans i aclarir llargament amb aigua corrent.
 - Desinfectar amb etanol a l'70%.
 - Si es tracta d'una ferida oberta rentar amb aigua i sabó i ha continuació aplicar solució iodada i apòsit.
- **FINALMENT:**
 - SI CAL, TRUCAR A EL SERVEI D'EMERGÈNCIES (telf: 112) i / o ANAR A LA MÚTUA INDICADA DEPENDENT DE L'ADSCRIPCIÓ A EL IRB O UdL
 - Notifica-ALS RESPONSABLES DEL SCT I OMPLIR UN FORMULARI DE NOTIFICACIÓ D'ACCIDENTS.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 20 de 24

ACTUACIÓN (Qué Hacer?)

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



PAS, PDI : http://www.spri.udl.cat/cas_accident/index.html

ESTUDIANTES :
<http://www.spri.udl.cat/export/sites/Spri/alumnes/cas-accident/Protocol-accident-estudiants.pdf>

IRB : .SPA MC-Prevención-Lleida

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 21 de 24

13. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC

Considerem transport de Mostres de risc biològic, el recorregut de les mostres des del lloc d'origen fins a les instal·lacions de l'IRB destinades a la seva manipulació

Les mostres s'han de guardar en un contenidor primari estanc, a prova de fuites i degudament etiquetades en relació al seu contingut.

Aquest contenidor primari recobert de material absorbent per recollir Possibles abocaments, ha d'anar dins d'un contenidor secundari "protector", és a dir, robust, estanc, a prova de fuites i resistent a desinfectants químics.

En cas de transport regulat (entre centres), cal un contenidor terciari correctament identificat amb la mostra que conté. Les mateixes empreses de transport el subministren.

En mostres líquides:

Tubs o flascons hermètics d'un sol ús que contingui la mostra dins de caixes de plàstic (ex. Crioboxes) que permetin mantenir els tubs en posició vertical. Aquestes caixes, alhora, recobertes de paper absorbent i dins de recipients de plàstic grans i estancs com ara una nevera portàtil tipus càmping.

En mostres sòlides:

Flascons o contenidors de plàstic d'un sol ús amb la mostra al seu interior, dins de caixes de plàstic estanc, recobertes amb paper absorbent i dins de recipients de plàstic gran i estanc com podria ser una nevera de càmping.

Tubs o flascons hermètics i contenidors: Falcon tubs de 15-50mL, tubs d'extracció de sang ...



Contenidors Primaris:

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 22 de 24



Contenidors secundaris:



Enviament reglat:



13.1 Exemple de com transportar lentivirus correctament:

Les partícules víriques que estan presents en el medi de cultiu es recullen en tubs de 15 o 50ml. Aquests tubs han de tancar hermèticament i es transportaran en un segon contenidor hermètic de plàstic amb paper absorbent (veure imatge a sota). Això minimitza el risc de caiguda i ruptura del tub amb virus.

Els tubs es transporten fins a una sala climatitzada per a congeladors (sala 3.14). La sala és d'accés restringit amb targeta per a personal autoritzat. Un congelador de -80°C està adequadament senyalat i es on es disposaran els tubs amb virus. Aquests tubs han d'estar ben etiquetats com a lentivirus defectius o no replicatius, la data de producció, el nom del gen insertat, l'espècia d'origen i el nom del investigador productor.

Per la seva utilització, els tubs es recullen del congelador de -80°C i es transporten novament a un segon contenidor hermètic de plàstic amb paper absorbent fins a una cabina de bioseguretat de tipus II, on s'infectaran les cèl·lules a estudiar en condicions de confinament 2.

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 23 de 24

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 Recommendations on the 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. Universitat de Lleida. Febrero 2019.

UNE-EN12128:1998

Xiao, C.Y., Fu, B.B., Li, Z.Y., Mushtaq, G., Kamal, M.A., Li, J.H., Tang, G.C., Xiao, S.S., "Observations on the expression of human papillomavirus major capsid protein in HeLa cells", Cancer cell international 2015 15:53

Lin Y.C, Boone M., . Meuris L, Lemmens I., Van Roy N., . Soete A, Reumers J., Moisse M., Plaisance S., Drmanac R., Chen J., Speleman F., Lambrechts D., Van de Peer Y, Tavernier J., Callewaerta N., "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations". Nat 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, and Young RD (1961). "Tumors induced in hamsters by injection of 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 model for primitive neuroectodermal tumors in transgenic neural transplants harboring the SV40 large T antigen" Am J Pathol. 1994 Mar;144(3):556-64.

Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC (2007). "SV40 association with human malignancies and mechanisms of tumor immunity by large tumor antigen". Cell. Mol. Life Sci. 64 (7–8): 803–14

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 3	Mod: 2	Data ed. o mod: 21/01/2020	pàg 24 de 24

ANNEX I. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris

- Les campanes de flux laminar s'han de desinfectar a fons un cop a l'any. Aquestes passen una revisió del flux i de el nivell de partícules anual. La seva superfície i parets s'han de netejar i desinfectar amb alcohol cada vegada que s'utilitzin.
- La campana d'hipòxia passa una revisió un cop a l'any. L'oxigen s'ha de calibrar un cop al trimestre.
- Els laboratoris de cultius han de tenir una neteja bàsica diària, així com una de més profunda una o dues vegades a l'any per minimitzar l'acumulació de pols i altres partícules.
- Els tancs de nitrogen líquid s'han de revisar periòdicament assegurant una fase líquida i una de vapor dins dels tancs on es guardin les cèl·lules. Aquests s'ompliran en funció de les necessitats.
- Els nivells de gasos de CO₂, N₂ i aire sintètic s'han de revisar periòdicament per assegurar el subministrament als incubadores hi ha la cambra d'hipòxia.
- **L'incubador** ha de rebre CO₂ a una pressió de 0.8-1.5 bars. Cal desinfectar-lo a fons (canvi de filtres, desmuntatge ...) dues o tres vegades a l'any o en funció de la necessitat. Durant la resta de l'any cal netejar la base, les portes i la safata d'aigua periòdicament.

Els banys s'han de netejar periòdicament amb aigua i sabó i omplir-los fins a cobrir la resistència amb aigua destil·lada. El capçal del bany, si sona l'alarma pot ser per sobreescalfament, cal afegir més aigua al bany i fer-li un reset al capçal (botó petit a la part posterior a què cal accedir amb una punta de bolígraf).

- Els llums dels microscopis de mercuri, lupes i llums de fluorescència s'han de canviar quan es fonen o quan han sobrepassat el seu nombre màxim d'hores de vida. En aquest moment s'han de revisar els microscopis i comprovar que les noves llums estan ben centrades.
- Per a qualsevol incident o avaria s'ha de contactar amb el servei tècnic de l'aparell en concret.