

 Universitat de Lleida 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 1 de 35

Servei de Cultius Cel·lulars

Normes de funcionament

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 2 de 35

Contingut

1. OBJECTIU:	3
2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:	3
3. PERSONAL AUTORITZAT	3
3.1. Dades dels responsables:	3
4. INTRODUCCIÓ	4
4.1. Què és el cultiu Cel·lular?	4
4.2. Servei de Cultius Cel·lulars de Biomedicina, Lleida	4
5. DESCRIPCIÓ DE CULTIU CEL·LULAR, RISCS I LABORATORIS:	5
6. NORMES BÀSIQUES DE LES SALES DE CULTIUS CEL·LULARS	8
SOLUCIONS DESINFECTANTS DE LES SALES DE CULTIUS:	10
7. APARELLS DEL SERVEI: INSTRUCCIONS D'ÚS.	11
7.1. CABINES DE FLUX LAMINAR:	12
7.1.1. PNT CABINA FLUX LAMINAR	14
7.1.2. PNT CABINA BIOSEGURETAT II (BIOIIA)	16
7.2. INCUBADORES DE CO ₂ :	18
7.3. MICROSCOPIS I LUPES	19
7.5. BANYS:	22
7.6. TANC DE N ₂ LÍQUID (-196°C) (<i>més informació al PNT-CC-18</i>):	23
7.7. CAMBRA D' HIPÒXIA	24
8. CONTAMINACIÓ DELS CULTIUS	25
9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:	26
10. CONTROL DE MICOPLASMA:	27
11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:	28
12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:	29
13. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC	30
13.1 Exemple de com transportar lentivirus correctament:	32
14. SANCIONS I AMONESTACIONS	33
15. CITACIÓ A LES PUBLICACIONS	33
16. TARIFACIÓ	33
BIBLIOGRAFIA	34
ANNEX 1. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris	35

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 3 de 35

1. OBJECTIU:

Assegurar que tot el personal que directament o indirecta treballi amb experiments on s'utilitzen **cultius cel·lulars** de mamífers *wild type* o transformats de forma estable o temporal (OMG), rebin instruccions adequades.

Aquestes instruccions inclouran com a mínim, entrenament en tècniques de treball en asèpsia i en la bioseguretat dels organismes que s'usen en els experiments, permetent entendre i assumir 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 del 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.

Les instal·lacions del Servei de Cultius de la UdL-IRBLleida estan acreditades pel treball amb OMG de tipus II i per tant, compleixen amb els requisits dels laboratoris de contenció biològic de nivell 2 (NCB-2) amb les conseqüents característiques pròpies d'aquest nivell (característiques descrites a: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf) i compromentent el compliment de normes i protocols pels usuaris del servei.

2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:

Aquestes directrius s'apliquen als usuaris dels laboratoris de Cultius Cel·lulars de la UdL-IRBLleida.

3. PERSONAL AUTORITZAT

Als laboratoris de cultius cel·lulars només pot entrar el **personal autoritzat**.

Cada usuari tindrà un investigador responsable que es farà càrrec dels seus experiments i del compliment de la normativa i bona praxis dins del servei. L'IP omplirà una fitxa de grup (P-CC-28) on mencionarà els membres del seu grup que usaran el servei, amb quines cèl·lules treballarà i el nivell de bioseguretat que requereixen, i en quin projecte està vinculat per poder fer la facturació. El primer dia d'entrar al servei, els nous usuaris ompliran una fitxa amb les seves dades personals (P-CC-18) 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.

3.1. 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@irbllleida.cat	2953 12953
Tècnic superior de suport	Iván Hidalgo	despatx 2.4 Bio. II	ihidalgo@irbllleida.cat	2953 12953

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 4 de 35

4. INTRODUCCIÓ

4.1. 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, etc. 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.

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

4.2. Servei de Cultius Cel·lulars de Biomedicina, Lleida

El Servei de Cultius (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 en poden ser usuaris tots els investigadors dels diferents departaments de la Universitat de Lleida i de l'IRBLleida així com també investigadors externs, els quals podran cultivar i manipular tot tipus de cèl·lules de mamífers (tant cèl·lules primàries com línies cel·lulars estables) que tinguin un nivell de contenció Biològica 2 (NCB-2) o inferior, permetent estudiar i caracteritzar-les a nivell molecular i cel·lular. Els usuaris poden treballar a mode d'autoservei o amb el suport dels tècnics del servei. El servei també ofereix la possibilitat d'utilitzar una sala amb NCB-2 per manipular/cultivar mostres humanes. El servei no accepta i no té les instal·lacions necessàries per cultivar o aïllar agents biològics perillosos de risc 3 els quals requereixen un nivell de contenció 3 o superior, tal com passa amb el virus SARS-CoV-2.

En cas de necessitar manipular mostres humanes i/o agents biològics de risc 2 caldrà estar prèviament autoritzats pel comitè de Bioseguretat (comitebioseguretat@irblleida.cat).

Abans de treballar amb qualsevol cultiu s'ha de comprovar els requeriments de Bioseguretat del cultiu (en cas de dubte podeu consultar pàgines oficials com l'ATCC o al web: insst.es/databio-fichas-de-agentes-biologicos on especifica el nivell de bioseguretat necessari pel treball amb aquelles cèl·lules.

L'SCT-CC es troba ubicat a l'**edifici de Biomedicina a l'IRBLleida** i compta amb 6 sales amb nivell de contenció 2 amb característiques específiques per ús de cultius cel·lulars, una sala de dissecció i una zona de criopreservació cel·lular amb tancs de Nitrogen líquid.

- Lab -1.3:** Laboratori per treballar amb Línies estables.
- Lab 1.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire independent amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb Línies estables.
- Lab 2.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb cultius Primaris.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 5 de 35

- Lab 2.16:** Laboratori de cultius amb pressió positiva, doble porta circulació d'aire independent amb entrada i sortida d'aire filtrat amb HEPA per cultius delicats (stem cells), de llarga durada i lliures de micoplasma i virus.
- Lab 3.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb cultius Primaris
- Lab 3.16:** Laboratori de cultius amb pressió negativa, doble porta circulació d'aire independent amb entrada i sortida d'aire filtrat amb HEPA per manipular o cultivar cultius de mostres humanes de NCB-2 i/o producció de lentivirus.
- Lab 4.11:** Laboratori de dissecció.

EQUIPAMENT DEL SERVEI:

L'SCT-CC compta amb:

16 INCUBADORS DE CO ₂	17 CAMPANES DE FLUX LAMINAR	6 CAMPANES DE BIOSEGURETAT IIA	2 CENTRIFUGUES refrigerades (1 amb tapa ANTIAEROSOLS)	4 CENTRIFUGUES RT
10 BANYS TERMOSTÀTICS	1 CABINA D'HIPÒXIA	1 LUPA DE FLUORESCÈNCIA	5 LUPES DE DISSECCIÓ	6 MICROSCOPIS INVERTITS FLUORESCÈNCIA AMB CÀMARA
4 MICROSCOPIS INVERTITS	5 VÒRTEX			

El laboratori 3.16 presenta unes directrius i normes específiques (DOC-CC-04). Els usuaris han de tenir una autorització específica abans de poder tenir-hi accés. Contacteu amb el personal del servei per més informació.

5. DESCRIPCIÓ DE CULTIU CEL·LULAR, RISCS I LABORATORIS:

5.1. 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 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

En l'SCT-CC hi ha diferenciats laboratoris per cultius primaris i per cultius de línies:

	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 6 de 35

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

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

Tots els laboratoris de cultius del SCT-CC estan acreditats com a sales de contenció de nivell 2, el qual exigeix entre d'altres:

- Sales independents de la resta de l'edifici
- Sistema de ventilació independent i amb filtració HEPA.
- Usuaris formats per manipular agents biològics
- Accés restringit a les instal·lacions
- Ús de cabines de bioseguretat per manipulació i/o cultiu d'agents biològics amb requeriment NCB2 especialment mostres i cultius humans
- Minimització de la producció d'aerosols i escatxigades, i sempre dins la cabina de bioseguretat o amb l'ús de centrífugues amb tapes antiaerosols.

5.2. Principals riscos biològics dels cultius:

Els cultius cel·lular de mamífers no contaminats amb altres agents biològics, generalment no presenten un risc pel manipulador significatiu, la possible inoculació dèrmica d'aquest cultiu origina només una inflamació local. De totes maneres, aquests cultius poden contribuir substancialment al risc del manipulador a l'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, citomegalovirus, Herpes símplex 1 i 2, SARS-CoV-2... Els cultius de cèl·lules animals no humans o de primats poden contenir Virus Hanta, cori meningitis limfocítica, virus de la influència, etc. Així com altres paràsits com la toxoplasmosis o el mycobacterium tuberculosis que podria estar present en teixits pulmonars humans, etc.

Altres cèl·lules i teixits de primats també presenten riscos pel personal de laboratori. Els perills potencials es presenten per cèl·lules transformades amb agents virals com l'SV-40, EBV o HBV, així com també cèl·lules que contenen material genòmic viral. Les cèl·lules carcinogèniques també resulten ser perilloses potencials com a resultat de l'auto-inoculació.

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 i de primats presenten un risc especial i es classifiquen en el grup de risc Biològic superior a 1. Pel que és molt important avaluar el risc biològic de cadascuna mirant les especificacions de bioseguretat en què ha estat classificada cada línia cel·lular i els seus procediments i protocols abans de treballar-hi.

Per exemple, les cèl·lules HeLa, de risc 2, tenen el virus del papil·loma integrat al DNA i s'han observat mRNA de la càpsida del virus (Xiao *et al.* 2015). En el cas de les 293T, també classificades de risc 2, s'ha

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 7 de 35

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 hàsters 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).

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*

Pràctiques Recomanades segons el manual de *Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina*. 4ª edición. CDC NIH:

Tant les cèl·lules humanes com també les d'altres primats han de ser manipulades utilitzant les pràctiques de contenció biològica Nivell 2. Tot el treball ha de realitzar-se en una cabina de Bioseguretat i tot el material ha de ser descontaminat abans de ser eliminat.

Tots els treballadors que treballin amb cèl·lules i teixits humans han de treballar conforme a les polítiques i guies establertes pel pla de control de la institució. Els treballadors han de realitzar-se una mostra de sèrum de base, rebre la oportunitat d'immunització contra la Hepatitis B i sotmetre's a una avaluació amb un professional de la salut després d'un incident d'exposició.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 8 de 35

6. NORMES BÀSIQUES DE LES SALES DE CULTIUS CEL·LULARS

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 exclusives per al treball al laboratori de cultius cel·lulars.
4. S'ha de treballar amb mascareta higiènica durant tota la tasca dins les sales, independentment que hi hagi més persones a la sala o no.
5. Es recomana portar pantaló llarg i sabata tancada.
6. 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. El parell de guants de treball només sortirà de la cabina per ser llençat al contenidor biològic.
7. Un cop utilitzats es trauran els guants de forma asèptica i tot seguit es rentaran les mans. No s'ha de sortir del laboratori amb els guants de treball posats. Podeu veure-ho a: <https://www.youtube.com/watch?v=pM8SEp5cLo8>
8. No es pot tocar amb els guants de treball posats la resta del laboratori ni la porta.
9. Per treballar a la sala 3.16 veure el document DOC-CC-04.
10. La majoria d'equipaments de les sales (les cabines de flux laminar, la hipòxia, la lupa de fluorescència i les lupes de dissecció) s'han de reservar utilitzant el programa Supersaas de la web següent amb una antelació màxima de 24h i mínima de 15 minuts: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanes_flux_laminar
11. Les superfícies de treball (Campanes, microscopis, poiates...) es desinfectaran a l'inici i al final de cada ús amb Propano-AF (barreja Isopropanol i EtOH) o "Actril" en el cas de treballar amb material potencialment perillós (medi de cultiu amb cèl·lules humanes, virus...).
12. En acabar de treballar, s'ha de recollir tot el material utilitzat i deixar la zona de treball neta i desinfectada després del seu ús.
13. Tots els materials, mostres i cultius contaminats hauran de ser descontaminats abans d'ésser eliminats. En el cas de la finalització de l'ús d'un cultiu que s'ha d'eliminar, aquest es neutralitzarà primer amb lleixiu, s'aspirarà el medi neutralitzat i s'eliminarà la placa al contenidor de residus biològics
14. **Els residus sòlids contaminats es llencen als contenidors de residu biològic (un sota cada campana).**
15. Els residus que continguin fàrmacs o substàncies citotòxiques es llencen al contenidor blau de citotòxics. En cas de residus citotòxics líquids es llencen a la garrafa de citotòxics líquids si també contenen agents biològics s'inactivaran prèviament amb lleixiu. **Comuniqueu al personal del servei la composició d'aquests residus líquids per prendre les mesures de seguretat adients.**
16. EL PAPER, PLÀSTIC, POREXPAN, etc. NETS i NO CONTAMINATS van als CONTENIDORS DE RECICLATGE (situats als passadissos).

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 9 de 35

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 dels pots d'aspiració 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. Tots els procediments tècnics (vòrtex de tubs, pipetejar, centrifugar...) s'han de fer de manera que minimitzi la formació d'aerosols i gotes. Exemples: les pipetes llargues no s'han de deixar enganxades a la pipeta per evitar degoteigs. Les mostres biològiques que contenen virus o fluids humans que s'hagin de centrifugar, s'utilitzarà la centrífuga amb tapes anti-aerosols sempre que sigui possible. Està prohibit pipetejar amb la boca.
19. El buit s'ha de tancar després de cada ús per evitar excés de treball de la bomba.
20. 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. El trasllat de cèl·lules entre laboratoris no està permès excepte amb permís propi del servei.
23. Tots els vessaments, accidents i/o exposicions directes (o potencials) a materials infecciosos han de ser comunicats al responsable del servei. A cada sala hi ha un registre on els usuaris hi han d'escriure tals accidents i incidents.
24. Les Cabines de flux laminar i les BioIIA **NO** són cabines extractores de fums ni tenen filtres de carbó actiu, pel que l'ús de productes tòxics volàtils es valorarà prèviament amb el personal del servei, en cas d'absoluta necessitat i tenint en compte el risc biològic que puguin tenir les mostres. L'ús d'aquestes substàncies en cabina no extractora de fums anirà sota la responsabilitat de l'IP així com qualsevol reparació d'aquesta deguda a l'ús d'aquests productes.
25. **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 comitè de Bioseguretat (comitebioseguretat@irbllleida.cat)**

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 10 de 35

SOLUCIONS DESINFECTANTS DE LES SALES DE CULTIUS:

Etanol 70% Efecte immediat, s'ha de retirar a continuació. No utilitzar sobre metacrilat

Etanol 80% Efecte immediat, s'ha de retirar a continuació. No utilitzar sobre metacrilat

Propano-AF: 52% etanol+12% isopropanol. Efecte immediat, s'ha de retirar a continuació. No utilitzar sobre metacrilat.

Lleixiu 70%, el lleixiu va perdent efecte desinfectant a mesura que està en contacte amb l'aire i la llum. L'ús recomanat per desinfeccions en líquids amb microorganismes és al 2% d'hipoclorit de sodi. El lleixiu comercial conté un 5-6% d'hipoclorit de sodi, per tal que duri una mitjana de 3-4 dies es prepara al 70% de lleixiu el qual quedarà al 4% d'hipoclorit de sodi.

Actril: Producte comercial desinfectant d' àcid peracètic, peròxid d'hidrogen i àcid acètic) Deixar actuar 10 minuts abans d'assecar. És viricida i esporicida.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 11 de 35

7. APARELLS DEL SERVEI: INSTRUCCIONS D'ÚS.

Contingut:

7.1 Cabines de Flux Laminar.....	11
7.2 Incubadors de CO ₂	18
7.3 Microscopis i Lupes.....	19
7.4 Centrifugues.....	21
7.5 Banys.....	22
7.6 Tancs de N ₂	;Error!
Marcador no definido.	
7.7 Càmera d'Hipòxia.....	24

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 12 de 35

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 asèptica evitant l'entrada de l'aire no filtrat turbulent exterior.

La seva funció és la de mantenir una àrea 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 (químics o biològics).
- el producte dels diferents agents biològics contaminants.
- el medi ambient (extern a la cabina) d'agents de risc biològic

b. Tipus de cabines:

Cabines de flux laminar horitzontal

Les cabines de flux laminar horitzontal són adequades per a una bona protecció del producte, però no del manipulador, ja que tot l'aire interior s'extrau directament cap al 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 de l'interior de la campana 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 prèviament filtrat per HEPAs i el 70% restant recircula. A l'interior de la cabina es treballa amb pressió negativa conferint més seguretat al manipulador. És la més adequada pel treball amb agents biològics de risc 2 o que requereixen un NCB-2.

* **Les cabines 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: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 13 de 35

- Producció de virus lentivirals, retrovirus, altres.
- Infecció de línies cel·lulars o cultius primaris amb partícules virals de risc 2.
- Cultius primaris i manipulació de cèl·lules humanes.
- Cultius de línies humanes catalogades amb risc biològic tipus II. Per exemple: Cèl·lules HeLa o 293T.

TIPUS DE CABINES EN FUNCIÓ DEL RISC:

		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

Ref: NTP 233: Cabines de seguretat biològica

BIOSEGURETAT EN ELS DIFERENTS TIPUS DE CULTIU CEL·LULAR:

CULTIU CEL·LULAR	CONTENCIÓ
Línies cel·lulars ben caracteritzades d'origen humà o de simis. Línies cel·lulars no humanes ni de simis, ben caracteritzades amb baix risc d'infecció endògena amb patògens humans.	Nivell de contenció 2 i ús de cabina de bioseguretat
Línies cel·lulars o soques no totalment caracteritzades o autenticades	Nivell de contenció 2 i ús de cabina de bioseguretat
Cèl·lules amb patògens endògens i cèl·lules infectades deliberadament	Contenció adequada al patògen
Cèl·lules sanguínies humanes, cèl·lules limfoides, teixit nerviós d'origen humà o de simi	Contenció adequada al risc potencial.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 14 de 35

PNT DE TREBALL A LES CABINES

7.1.1.CABINA FLUX LAMINAR

OPERACIONS PRÈVIES

1. RESERVA DE LA CAMPANA A LA WEB: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanes_flux_laminar
2. PREPARACIÓ DEL MATERIAL
3. PREPARACIÓ SOLUCIÓ DESINFECTANT
4. COL·LOCACIÓ DELS EPIS

- a) Netejar les superfícies de la cabina amb solució alcohòlica (Propano-AF, (barreja d'etanol i isopropanol) o etanol al 70%) present a la sala, utilitzant la tècnica de l'escombrat. A les pantalles de metacrilat usar lleixiu diluït, l'etanol degrada el metacrilat.
- b) Introduir material, ruixat amb solució alcohòlica a la cabina el més centric possible i degudament separat perquè els raigs ultraviolats puguin arribar a tot el material, i deixant les reixetes d'extracció d'aire lliures per un bon manteniment de l'asèpsia dins la campana.
- c) Encendre el llum Ultraviolat (UV), són UVC (d'alta energia, perillós per pell i ulls) durant 10' i el flux (si es pot, sinó s'encendrà després dels ultraviolats. Passa't aquest temps, aturar el llum UVC i encendre la llum blanca.
- d) Treballar amb bata de màniga llarga, mascareta higiènica (min.) i guants.

BONA PRAXIS DINS LA CABINA

- e) Separar la zona de treball en: zona neta, zona de treball i zona bruta.
- f) Introduir medis, mostres i tampons secs d'aigua del bany i ruixats amb solució alcohòlica prèviament.
- g) Treballar poc a poc i concentrats per evitar moviments bruscs que provoquin turbulències (→punt de contaminació) i producció d'aerosols.
- h) No passar els braços per sobre de les mostres obertes→punt de contaminació
- i) No introduir llibretes, calculadores, caixes de cartró o paper dins de la campana, →punt de contaminació.
- j) No tocar amb els guants el material estèril que entrarà en contacte amb les cèl·lules. En cas de dubte, descartar el material o identifiqui la placa per fer-li un seguiment.
- k) Obrir el material estèril dins la campana. S'ha d'evitar la reinserció del material ja utilitzat al medi de cultiu o tampó.
- l) 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).
- m) Eviteu deixar els taps de les ampolles i tubs directament 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 cara amunt,

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 15 de 35

deixar-lo cap per amunt i lluny de l'àrea de treball, per no passar el braç per sobre.

RESIDUS

- n) Llençar el material que ha estat en contacte amb la mostra biològica al contenidor de residus biològics.
- o) Si heu d'eliminar cèl·lules, aspirar el medi, afegir lleixiu diluït durant 5-15 minuts, aspirar-lo i descartar la placa als residus biològics.
- p) Tireu la pipeta Pasteur d'aspiració en el contenidor de residus biològic i desinfecteu el tub d'aspiració primer amb lleixiu al 70% i després amb solució alcohòlica fins que no quedin restes de medi de cultiu en el tub i el dipòsit de residus líquids viri a color neutre (sense color).
- q) Els residus citotòxics es llencen al contenidor per citotòxics (blau) o a la garrafa present a la sala.

FINALITZACIÓ

- r) Netegeu la superfície de la cabina i desinfecteu-la amb Propano-AF o Actril (tenint en compte les mesures de seguretat) i deixeu els UV funcionant 10-20 minuts mínim

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 16 de 35

7.1.2.CABINA BIOSEGURETAT II (BIOIIA)

OPERACIONS PREVIES

1. PREPARACIÓ DE MATERIAL
2. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS DESINFECTANTS
3. PREPARACIÓ DE ZONA DE DESCONTAMINACIÓ DE MATERIAL AMB DESINFECTANT
4. COL·LOCACIÓ DELS EPIS

- a) Abans de fer cap procediment, es netejaran les superfícies de la campana amb la solució alcohòlica present a la sala del 80% min. en alcohol o Actril® fent servir la tècnica de l'escombrat.
- b) S'introduirà tot el material a la campana excepte buffers i mostres, s'engegarà els llums ultraviolats (UV) durant min 10-15 minuts amb la tapa frontal baixada. Tot seguit s'apagaran els UV i s'engegarà el flux. Fins que el flux no ha re-circulat i porta el cabal adequat no és segur treballar a dins la campana.
- c) Treballar amb bata de màniga llarga, mascareta higiènica (min.) i guants. En cas de fer procediments amb produccions d'aerosols o amb risc d'escatxigades utilitzar ulleres de protecció ocular i doble bata de màniga llarga, bata d'un sol ús o "manguitos".
- d) Per treballar a la BioIIA s'utilitzarà doble guant. Els guants en contacte amb la pell seran de nitril. Es recomanen els de categoria III complint la **EN ISO374-5:2016** (substituta de la EN374:2003 especificació virus o 374-5). Si es necessita sortir de la campana per realitzar una altra tasca, s'han de canviar els guants externs abans de tocar qualsevol altre superfície. Un cop utilitzats es trauran de forma asèptica el primer parell de guants. (Es treballarà a uns 10cm a l'interior de la campana, evitant tapar les reixes d'extracció de l'aire per permetre la bona seguretat de l'usuari.
- e) A dins la campana hi ha d'haver el material mínim imprescindible prèviament pensat, per evitar haver d'entrar i sortir d'aquesta mentre es treballa.
- f) Mentre no es treballi, l'interior de la campana ha d'estar buit. A la Bio-II-A únicament es manté a dins un contenidor groc per residus punxants.
- g) L'aspiració no es podrà utilitzar quan es manipulen mostres humanes.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 17 de 35

ACCIONS A REALITZAR - PROTOCOL dins la BIOIIA

- h)** Repartiu l'espai de la campana en zona neta, zona de treball i zona bruta.
- i)** El material no s'ha d'acumular en un punt, sinó que es repartirà per aconseguir una bona distribució del flux i evitar turbulències.
- j)** Trebal·leu a poc a poc, concentrats evitant els moviments bruscs que podrien afavorir la producció d'aerosols.
- k)** Si protocol és de producció de virus, aquests virus s'hauran de guardar al congelador -80°C de l'IRB destinat al seu emmagatzematge, on estaran degudament tancats hermèticament i amb indicacions de perill biològic.

RESIDUS

- l)** Llenceu el material petit contaminat (punts, tubs...) al contenidor de residus grocs o a una bossa d'un sol ús de tancament hermètic i els residus punxants al contenidor de residus groc situat dins de la campana. Intentant neutralitzar-lo sempre que sigui possible. Els tubs que tenen tapa es llençaran tancats amb la seva tapa. Un cop finalitzat el treball, tanqueu la bossa de plàstic hermèticament i llenceu-la al contenidor de residus biològics.
- m)** Llenceu les pipetes llargues al vas de precipitats amb aigua i sabó que podeu trobar dins de la campana. A l'acabar, agafeu les pipetes llargues, espereu que tot el líquid neutralitzat s'hagi escorregut, re introduïu-les en els seus embolcalls originals i llenceu-les al contenidor de residus biològics.

DESCONTAMINACIÓ I NETEJA DE LA CAMPANA I ÀREA DE TREBALL

- n)** Tots els materials, mostres i cultius contaminats o actius hauran de ser descontaminats abans d'eliminar-los. En el cas de líquids que s'han d'eliminar, (si no es poden tancar en una bossa de tancament hermètic) es neutralitzaran primer amb lleixiu, es col·locaran en un pot amb tapa i s'eliminarà la placa/el pot en el contenidor de residus sòlids. En cas de volums amb necessitat d'aspiració s'han de neutralitzar amb un producte que el seu rendiment no es vegi afectat per la quantitat de matèria orgànica (Actril®, sosa...) demanant permís als responsables de la sala.
- o)** Quan acabeu de treballar, retireu els reactius de la campana descontaminant-los exteriorment amb Etanol al 80% o Actril®, descontamineu el material de treball i residus deixant-lo dins de la campana ruixat amb Etanol al 80% i amb els llums UV 10 minuts mínim. Un cop passat aquest temps, es llençaran els residus al seu contenidor i es retirarà el material de treball.
- p)** Qualsevol material que hagueu d'entrar i/o sortir de la campana, s'ha de netejar exteriorment amb un paper impregnat amb solució etanolitzada.

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: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 18 de 35

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, al servei de cultius estan programats per les condicions òptimes al creixement de cèl·lules de mamífer.

- Temperatura de 37°C: temperatura fisiològica de les cèl·lules de mamífer
- Concentració de CO₂ (5%): per mantenir el pH adequat pel seu creixement. El medi de cultiu actua com la sang en els animals. El CO₂ es dissolt en l'aigua formant bicarbonat, la majoria del CO₂ present a la sang es troba en forma de bicarbonat (HCO₃⁻), aquest actua com a tampó de pH, permeten fluctuacions de gasos, nutrients i metabòlits sense causar canvis perillosos en el pH sanguini).
- Humitat elevada (per evitar l'evaporació de l'aigua del medi de cultiu).

Per mantenir aquestes constants presenta dues portes, una exterior i una interior de vidre la qual pot estar temperada. L: porta transparent permet la localització de les plaques i evitar obertures prolongades. 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 s'han de col·locar sobre de safates per facilitar el dipòsit de plaques a les prestatgeries de l'incubador corresponent (primaris, línies, virus) i per evitar vessaments a l'incubador. Les safates són propietat de cada grup i 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.
3. Les plaques s'han de manipular amb guants o mans etanolitzades per evitar contaminacions als cultius.
4. La manipulació de plaques de cultiu s'ha de fer amb cura per evitar vessaments agafant-les de manera que no s'obri la tapa i no perdi l'horitzontalitat.
5. Les safates on es deixen les plaques s'han de rentar habitualment per part de l'usuari per evitar creixement de fongs o bacteris. En cas de vessament a la safata, s'ha d'absorbir amb paper mullat en lleixiu i, finalment, desinfectar-lo amb Propano-AF. Si es produeix en un experiment amb virus, deixar el lleixiu o l'Actril actuar durant 15 minuts. Ha d'informar-se al registre d'incidències (P-CC-09) i als tècnics del servei.
6. Quan el vessament es trobi a l'interior de l'incubador, s'aplicaria el mateix procediment que el punt 4, i la comunicació de la incidència als tècnics del servei és absolutament obligatòria.
7. Si un dels cultius es contamina, haurà de ser eliminat immediatament de l'incubador i anotat al registre de contaminació (P-CC-10) del laboratori.
8. Els incubadores es calibren diàriament automàticament. Mentre l'incubador s'està calibrant **NO** es pot obrir la porta per evitar realitzar una calibració errònia falsejant la configuració de les constants.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 19 de 35

7.3. MICROSCOPIS I LUPES

- **Instruccions generals:**

1. Netejar els oculars amb paper i Propano-AF i la platina on dipositem la mostra a observar, així evitarem problemes de contagi de contaminacions entre usuaris i dels cultius.
2. Col·locar la mostra a la platina, posar els augments necessaris i enfocar per a visualitzar les mostres.
3. Tot usuari ha de preguntar per demanar ajuda i formació quan hi hagi qualsevol funció del microscopi/lupa desconeguda. L'usuari **NO pot manipular funcions que no coneix del microscopi**
4. Recordeu de tancar el llum de microscopis i lupes a l'acabar de treballar.
5. Al laboratori 1.9 , 2.16 i -3.16 tapeu els microscopis i lupes si sou l'últim usuari que va a treballar. A la nit s'encenen els UV a la sala i cal protegir els aparells.

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.

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 apagat, s'ha d'esperar 10 minuts abans de tornar a encendre. Per gestionar el manteniment de la làmpada de fluorescència, els usuaris han de registrar el nombre d'hores que la bombeta ha

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 20 de 35

treballat al formulari de registre P-CC-07.

- Els microscopis i els estereomicroscopis de fluorescència d'altres sales tenen bombetes halògenes o LED.
- Les càmeres associades a elles es poden utilitzar per fer fotos dels experiments realitzats a les sales de cultiu de teixits. **Qualsevol usuari amb cèl·lules vives tindrà prioritat davant de qualsevol usuari de cèl·lules fixades**, fins i tot si aquest ha reservat el microscopi al registre P-CC-06.
- Cal seguir instruccions específiques per a cada programari. Pregunteu als tècnics del servei en cas de dubte.

7.3.3 Lupes de dissecció

a. Definició:

Els estereomicroscopis augmenten de 4 a 50 vegades la mostra per facilitar la dissecció del teixit. S'utilitzen als laboratoris de cultius primaris. Està dissenyat per a l'observació d'una mostra a baixos augments, normalment utilitzant llum reflectida des de la superfície d'un objecte en lloc de transmetre-la a través d'ella.

- Durant la dissecció s'ha de vigilar amb el material punxant i el risc biològic que comporta.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 21 de 35

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.
 - El programa més comú per centrifugar cèl·lules: 1000 rpm 5' a Temperatura Ambient.
- 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 deixeu actuar el lleixiu uns 15 minuts dins la BioIIA i seguidament amb etanol.
- **Centrifuga amb tapa anti-aerosols**
 - Traieu els cubells amb els adaptadors de tubs de la centrífuga i obriu-los a la campana de BioIIA.
 - Inseriu als adaptadors els tubs tancats hermèticament.
 - Tanqueu els cubells amb la tapa antiaerosol i torneu a inserir-la a la centrífuga.
 - Utilitzeu el programa adequat.
 - Un cop acabada la centrifugació i oberta la centrífuga, cal portar el cubell tancat a la campana de BioIIA. S'ha d'obrir dins de la cabina, retirar els tubs i tornar a portar el cubell a la centrífuga, comprovant que no s'hagi produït cap vessament.
 - Si es produeix un vessament al rotor de la centrífuga, l'usuari ha d'esperar per obrir-la i així, evitar que es dispersin els aerosols. Seguiu PNT-CC-19. S'ha d'eliminar el material trencat amb doble guant, esterilitzat amb lleixiu o Acril, deixar-lo dins de la campana de BioIIA amb llum ultraviolada durant 20 minuts. Tot el material s'ha de neutralitzar i la centrífuga, el rotor, el cubell i els adaptadors de tubs netejar i esterilitzar abans de tornar-los a utilitzar.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 22 de 35

7.5. BANYS:

a. Definició:

Els banys d'aigua termostàtics es componen d'una cubeta on es disposa l'aigua i el capçal, que escalfa l'aigua amb l'ajut d'una resistència, i es distribueix un cop s'escalfa a través d'un rotor.

Els banys termostàtics s'utilitzen per escalfar medis de cultiu o tampons, processar reaccions químiques o descongelar mostres congelades. Estan programats per mantenir l'aigua calenta a 37°C.

S'omplen d'aigua no estèril i, ja que la temperatura que arriba l'aigua és l'ideal per al creixement de microorganismes i algues contaminants, la precaució d'assecar bé i etanolitzar tots els materials introduïts al bany serà una norma important per evitar contaminació en els cultius.

Instruccions d'ús:

- La cubeta s'ha d'omplir amb aigua destil·lada fins que cobreixi la resistència. Alguns banys termostàtics es bloquegen si s'encenen si no hi ha prou aigua; en aquest cas, s'ha d'afegir més aigua i s'ha de ressetejar el capçal abans de tornar-lo a encendre.
- Engegueu el bany, estan programats per treballar a 37°C. No s'ha de canviar la temperatura sense permís dels supervisors del laboratori, triguen uns 15 minuts aproximadament a assolir la temperatura de 37 °C.
- Els tubs i ampelles que s'han d'introduir al bany han d'estar fixats de manera segura, amb flotadors, racks o pesos, per evitar que es vessin i contaminin el bany i el producte.
- Quan no hi hagi ampelles ni tubs al bany, s'ha d'apagar.
- En cas de vessament d'algun reactiu / cèl·lules al bany s'avisarà al personal tècnic per a procedir amb la descontaminació del mateix.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 23 de 35

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

a. Definició:

Tanc que conté N₂ líquid el qual té un alt poder frigorífic (-196°C) i s'utilitza per emmagatzemar les línies cel·lulars. Per congelar les cèl·lules en condicions adequades reviseu els protocols designats per a cada línia cel·lular que permeten mantenir la seva viabilitat durant molt temps (anys) sempre que no es trenqui la cadena de fred.

b. Instruccions d'ús:

- El nitrogen líquid s'ha de manipular amb guants i és convenient protegir els ulls i portar sabates tapades per protegir els peus de possibles esquixades. El contacte directe amb la pell produeix cremades.
- Els tancs estan tancats i els usuaris han de demanar cita als supervisors del servei per obrir-los i recollir o deixar mostres.
- En cas que un usuari tingui permís per obrir un tanc sol, haurà de tenir en compte el següent:
 - L'usuari ha de saber on es troben les mostres abans d'obrir el tanc per evitar l'evaporació excessiva del N₂. El gas N₂ desplaça l'oxigen; els usuaris han de llegir les normes de seguretat abans d'utilitzar-lo (PNT-CC18).
- Mai no s'ha de tenir un tanc amb uns nivells inferior a 15 cm de N₂ (l). Cal tenir en compte que el nitrogen desplaça l'oxigen, de manera que el l'encarregat d'omplir-los ha d'estar a una certa distància del tanc mentre omple els tancs o dewars.

c. Accidents i seguretat:

En cas d'emergència per vessament de Nitrogen Líquid, la ventilació ha d'esser imperatiu; les portes exteriors s'han d'obrir per facilitar l'eliminació del nitrogen gas. 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 transformant, 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 i registrarem el registre.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 24 de 35

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, incubar, examinar i treure sense perdre les condicions ambientals preestablertes.

La cabina d'hipòxia no es una cabina de Bioseguretat; l'aire que expulsa no està filtrat ni és de flux laminar. Abans d'usar-per primera vegada, contacteu amb els tècnics del servei.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 25 de 35

8. CONTAMINACIÓ DELS CULTIUS

Els cultius cel·lulars in vitro poden contaminar-se fàcilment ja que la seva proporció de creixement és menor que la majoria dels microorganismes i virus que es presenten al seu entorn. La majoria dels cultius cel·lulars es contaminen amb bacteris, fongs i virus. Les bactèries grans es detecten fàcilment ja que alguns medis tenen indicadors de color de pH i poden virar més ràpidament de l'habitual de roig a un color groc quan s'acidifica el medi, cosa que significa consum de nutrients. Es pot detectar una olor específica o a través d'un microscopi veure el tipus de bacteri que determina la contaminació. Les bactèries petites com el micoplasma (0,2 µm) no es detecten fàcilment, ja que no hi ha símptomes visibles (veure el punt 10 de les directrius). La detecció de fongs pot determinar-se per mitjà de microscopis si els fongs tenen la capacitat de gemmació i creació d'òrgans filamentosos. La detecció de virus només es pot avaluar mitjançant tècniques moleculars o antigèniques.

8.1. Focus de contaminació

- Una de les principals fonts de contaminació al laboratori de cultius cel·lulars és el propi usuari.
En els laboratoris de cultiu cel·lular és molt difícil treballar completament lliure de microorganismes, però podem reduir la seva densitat tenint en compte la font de contaminació:
Sovint, els cultius es contaminen amb microorganismes que provenen de les mans, la boca, la cara o la roba. Per evitar, s'haurien d'utilitzar guants, bata llarga de laboratori i rentar-se les mans amb sabó cada vegada que es vulgui treballar, així com desinfectar tot el material i els punys de la bata.
- Una altra gran font de contaminació és la roba. L'usuari ha d'utilitzar una bata de laboratori neta abans de treballar al laboratori i utilitzar calçat diferent per ajudar en gran mesura a reduir la quantitat de gèrmens a la sala. Utilitzar roba de llana mentre es treballa a les cabines és un font de contaminació.
- Un altre focus molt important de contaminació són les restes d'aigua del bany introduïts a la campana i tocats per error. Si dubtem d'un medi contaminat, analitzem una alíquota de medi, incubant aquest a la sala d'incubadors per a bacteris per a no posar en risc altres cultius o altres usuaris. En el cas que la contaminació sigui d'un cultiu d'un experiment molt important, es canviarà el medi amb un de nou i es pujarà la dosi i/o es canviarà l'antibiòtic.

Mètodes bàsics de bones pràctiques per evitar contaminacions:

- ➔ L'usuari ha d'utilitzar una bata de laboratori neta (específica per a treballar a la sala de cultius cel·lulars).
- ➔ L'usuari ha d'usar guants asèptics mentre treballa.
- ➔ Es recomana ruixar amb solució alcohòlica mans i mànigues.
- ➔ L'usuari ha d'evitar el contacte amb el material estèril que entra en contacte amb el cultiu.
- ➔ L'usuari ha d'evitar passar la mà o el braç sobre del material obert que estarà en contacte directe amb la mostra.
- ➔ L'usuari ha de treballar en la part central de la cabina.
- ➔ Un cop que l'usuari està treballant a la cabina, no ha de contestar el telèfon, tocar els poms de les portes, rascar-se el cabell, el nas, etc. Ell/a ha de canviar els guants si ocorre un dels anteriors.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 26 de 35

- ➔ La superfície de la campana ha d'estar neta i buida abans de treballar, evitant que el material estigui molt a prop l'un de l'altre.
- ➔ Al retirar qualsevol tub o ampolla del bany, s'han d'assecar amb paper i mullar-se i assecar-se novament amb Propà-AF.
- ➔ Els usuaris s'han d'assegurar que el flux d'aire i la llum ultraviolada puguin passar entre tots els objectes de la campana. Qualsevol material porós com caixes de cartró no s'ha d'introduir dins de la campana. La superfície de la campana ha d'estar lliure d'aglomeració de material.
- ➔ Per evitar o minimitzar la formació d'aerosols i contaminacions creuades que poden ocórrer durant el treball, l'usuari:
 - Ha de fer servir diferents ampolles / tubs de medi, tampons i reactius, per a cada tipus de cèl·lula.
 - No ha de treballar en paral·lel amb més d'una línia cel·lular en la campana.
 - No ha de treballar amb material no estèril o contaminat (o dubtós).
- ➔ Un altre punt important és com transportar les plaques des de la campana fins a l'incubador o el microscopi. Aquest punt és especialment important si es transporta material de risc biològic:

Al principi, la part exterior de les plaques que contenen el cultiu és estèril, però quan es retira d'aquest entorn ja no ho és. L'usuari ha de tenir cura amb la seva manipulació evitant obertures per error:

 - Els flascons o plaques s'han de agafar suaument, evitant moviments forts que puguin vessar el medi o fer que entrin en contacte amb la tapa, però amb fermesa al mateix temps per garantir que la tapa no s'obri accidentalment fora de la campana.
 - Els flascons o plaques han de tocar-se amb guants nets o amb les mans rentades amb sabó i ruixades amb etanol.
 - Els flascons o plaques han de col·locar-se en una safata dins de l'incubador.
 - Al mirar al microscopi, l'usuari ha de garantir la neteja del portaobjectes.
- ➔ Els cultius antics no han d'oblidar-se a l'incubador, poden ser una font de contaminació per a altres cultius.

9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:

- Quan un cultiu està contaminat o ho sospitem, tots els reactius utilitzats amb aquest cultiu han de ser substituïts o passar a quarantena. Per al segon cas, s'ha de incubar 1 alíquota de medi a la sala d'incubadors de bacteris (per no posar en perill els cultius d'altres usuaris).
- Quan una placa/pot de cultiu cel·lular està contaminat, s'ha d'anotar en el registre de contaminació (P-CC-10) i ha d'eliminar-se:
 - La placa contaminada s'ha de dur a una campana BioIIA, minimitzant la seva obertura i agregant producte des contaminants a la placa (lleixiu / Acril).
 - La descontaminació del producte s'ha de fer durant 10 minuts per assegurar-nos de la seva correcta descontaminació.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 27 de 35

- El líquid neutralitzat s'ha d'aspirar amb el sistema de buit o introduir-se en un tub hermèticament tancat.
- La placa/flascó s'ha de rebutjar en un contenidor de residus biològics.

Si l'experiment és insubstituïble, l'usuari pot intentar canviar el medi, reemplaçar tots els reactius i afegir antibiòtics específics per tractar de salvar el cultiu sense posar en risc els cultius d'altres usuaris. El cultiu s'ha de segellar amb Parafilm®.

Els cultius contaminats amb micoplasma en els laboratoris de Línies s'han de descartar o traslladar-se als laboratoris primaris.

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. hyorhinae* i *A. laidlawii*. És l'organisme que s'autoreplica més petit amb una mesura d'entre 0.2-0.8 µm. 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.
- 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:

- Recolliu **500-1000µl** de sobrenedant del cultiu cel·lular que hagi pogut estar al menys 48h en contacte amb les cèl·lules (preferiblement 72h) en un eppendorf de 1'5ml que tanqui correctament i aguant temperatures de 95°C. No s'acceptaran mostres infectades amb virus. Controleu que els tubs estiguin ben marcats per l'usuari.
- Congeleu la mostra i deixeu-la al congelador de cultius de la sala -1.3
- 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 del servei estan autoritzats per exigir el trasllat de la línia cel·lular a la sala adequada de primaris.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 28 de 35

11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:

- Qualsevol incident ocorregut, la persona que el troba ha de valorar la seva urgència, anotar-ho al registre d'incidències (P-CC-09) i comunicar-ho als supervisors del laboratori del servei, en persona, per correu electrònic, trucada telefònica interna nº 2953 o al mòbil 12953 o 664340756.
- Una incidència és considerada de resolució urgent quan la no actuació posa en risc el treball dels usuaris o la viabilitat de les cèl·lules a l'incubador. Els tècnics de laboratori han de prendre les mesures adequades i controlar la resolució.
- Quan la incidència és urgent i l'usuari no pot trobar cap tècnic del servei, s'ha d'analitzar quina acció podria corregir la incidència i dur-la a terme, exemples:

Incidència	Actuació
Un dels incubadors està danyat	Moure totes les plaques de tots els usuaris a altres incubadors que funcionin correctament.
Tots els incubadors d'un únic laboratori estan apagats, o presenten una fallada de el CO ₂	Intentar restablir el sistema elèctric (caixa de controls a la banda de la pica), si no se soluciona, moure totes les plaques a un altre incubador d'una altra sala.
Tots els incubadors de l'edifici estan apagats, o tenen fallada del CO ₂	Segellar els incubadors i evitar que ningú els obri per mantenir els seus paràmetres.
Altres equips (bany, centrifuga, microscopi, ...) fallen	Els usuaris poden utilitzar excepcionalment els equips de les altres sales a excepció de la sala 3.16.
Fallada elèctrica a la sala o l'edifici.	Incidència urgent a la OTI via web http://www.udl.cat/ca/serveis/oti/formulari/salut/

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 29 de 35

12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:

➤ Accident del manipulador amb agents de risc biològic:

Un accident pot ser un vessament de material bioperillós afectant una persona superficialment o amb lesions.

La roba que ha estat contaminada s'ha de treure i col·locar-se en una bossa de plàstic. Han de rentar-se amb lleixiu o similar i a alta temperatura. Depenent de la severitat de l'agent, la roba contaminada serà llançada al contenidor biològic.

Renti bé la pell i/o ferida amb aigua de l'aixeta (i sabó, depenent de la gravetat de la lesió).

Desinfectar amb etanol al 70% de l'àrea afectada.

Si es tracta d'una ferida oberta, apliqui povidona iodada (Betadine) i pegui guix. Depenent de la gravetat, l'usuari lesionat ha d'anar a l'hospital d'emergència apropiat.

VESSAMENTS

En cas de vessament de líquid amb material biològic, seguir el protocol PNT-CC-19 que trobareu dins el Kit de vessament present a la sala:

1. Cobrir el líquid amb paper absorbent o vermiculita i immediatament neutralitzar amb lleixiu concentrat durant 10-15 minuts.
2. Llençar el material adsorbent en els contenidors de residus biològics.
3. Desinfectar les superfícies amb solució Etanolitzada o Actril®.

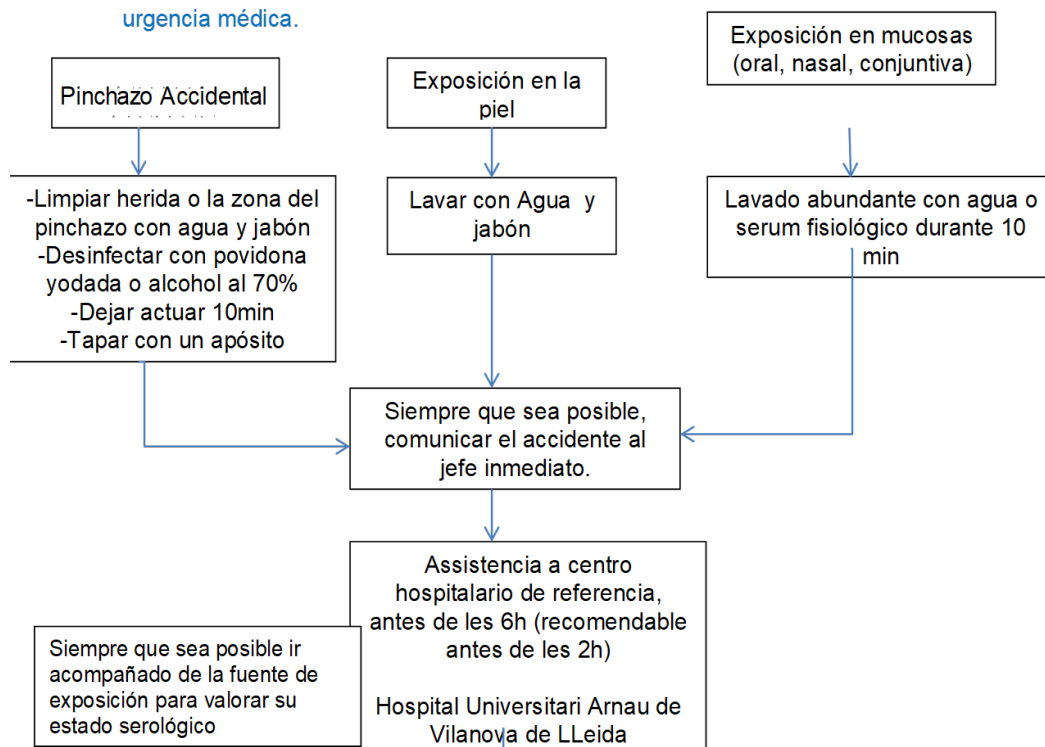
Els accidents amb material de risc biològic s'han de comunicar sempre a l'IP responsable de l'investigador i a el servei mèdic per seguir la traçabilitat d'una possible malaltia.

- **NORMA GENERAL:** La majoria dels agents de risc manipulats s'inactiven amb lleixiu (hipoclorit sòdic) i Actril. A més, en funció de l'agent també s'inactiven amb alcohol o sabó. En conseqüència:
- **SOBRE SUPERFÍCIES:** aplicar lleixiu o Actril, deixar actuar uns 10-15 min. i assecar amb paper de filtre que es tirarà al contenidor de biològic després desinfectar amb etanol al 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
 - NOTIFICAR ALS RESPONSABLES DEL SCT I OMLIR UN FORMULARI DE NOTIFICACIÓ D'ACCIDENTS.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 30 de 35

ACTUACIÓN (Qué Hacer?)

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



13. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC

El transport

Seguimiento posterior per la Mútua d'Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales

instal·lacions del IRBLleida per a la seva manipulació. El transport de mostres de risc biològic a les diferents sales de l'edifici IRBLleida per a la seva manipulació. El transport de mostres de risc biològic a les diferents sales de l'edifici IRBLleida per a la seva manipulació. El transport de mostres de risc biològic a les diferents sales de l'edifici IRBLleida per a la seva manipulació.

<http://www.prevencio.udl.cat/export/sites/Sprl/ca/.galleries/Accident/Que-fer-cas-accident-PAS-PDI.pdf>

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

<http://www.prevencio.udl.cat/export/sites/Sprl/ca/.galleries/Accident/Que-fer-cas-accident-PAS-PDI.pdf>

Aquest contingut ha d'anar dins d'un contenidor secundari, també estanc 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:

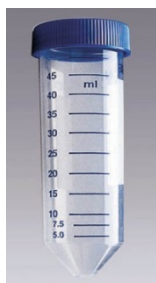
Tubs o flascons hermètics d'un sol ús que contingui la mostra dins de caixes de plàstic (ex. Crioboxes) que permetin mantenir els tubs en posició vertical. Aquestes caixes, alhora, recobertes de paper absorbent i dins de recipients de plàstic grans i estancs com ara una nevera portàtil tipus càmping.

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.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 31 de 35

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



Contenidors Primaris:

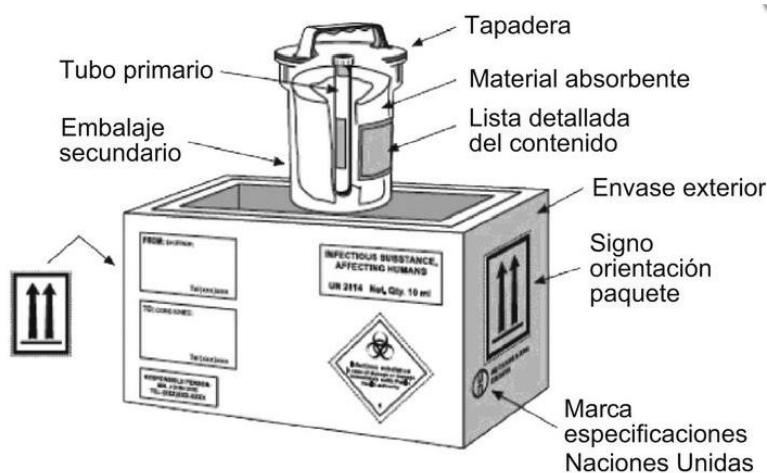


Contenidors secundaris:



Enviament reglat:

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 32 de 35



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'espècie d'origen i el nom de l'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 IIA, on s'infectaran les cèl·lules a estudiar en nivell de contenció 2.

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 33 de 35

14. SANCIONS I AMONESTACIONS

L'incompliment d'aquestes normes o de les del REGLAMENT INTERN del servei de cultius (<http://www.irblleida.org/ca/serveis-cientifico-tecnics/cultius-celulars/>) es traduirà en avisos a l'usuari i al seu IP. L'acumulació d'avisos o la seva severitat pot conduir a amonestacions. L'amonestació més greu és l'expulsió del servei de cultius.

15. CITACIÓ A LES PUBLICACIONS

En les publicacions, Tesis doctorals o treballs finals de Màster obtinguts a través de la utilització del servei, s'inclourà una frase als agraïments i es comunicarà al servei. A mode d'exemple: The human sample manipulation were performed in the Cell Culture Sientific & technical Service, Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.

16. TARIFACIÓ

Les tarifes d'ús de la sala venen determinades pel servei científic-tècnic de Cultius cel·lulars aprovades per la Comissió de Recerca de la UdL i el Consell de Govern anualment. Es poden consultar a:

<http://www.udl.es/export/sites/universitat-lleida/ca/recercaNew/serveis-cientifico-tecnics/.galleries/SCT-00001/Tarifes-SCT-2020ambindex.pdf>

 	DOCUMENTS SCT-CC			
	DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS			
DOC-CC-02	Edició: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 34 de 35

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., Callewaert 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: 4	Mod: 2	Data ed. o mod: 15/09/2020	pàg 35 de 35

ANNEX 1. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris

- Les campanes de flux laminar s'han de desinfectar a fons mínim un cop a l'any o cada vegada que hi hagi vessaments. 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.