



Universitat de Lleida
Serveis Científicotècnics
Laboratori de Cultius
Cel·lulars

DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE CULTIUS
CEL·LULARS

SERVEI CIENTIFICOTÈCNIC CULTIUS CEL·LULARS

**DIRECTRIUS DE
FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE
CULTIUS CEL·LULARS**

DOCUMENT: DC-002
DATA: 06/10/2022
REVISIÓ: 6



Contingut

1. OBJECTIU:	4
2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:	4
3. PERSONAL AUTORITZAT	4
3.1. Dades dels responsables:	4
4. INTRODUCCIÓ	5
4.1. Què és el cultiu Cel·lular?	5
4.2. Servei de Cultius Cel·lulars de Biomedicina, Lleida	5
EQUIPAMENT DEL SERVEI:	6
5. DESCRIPCIÓ DE CULTIU CEL·LULAR, RISCS I LABORATORIS:	6
6. NORMES BÀSIQUES DE LES SALES DE CULTIUS CEL·LULARS	9
SOLUCIONS DESINFECTANTS DE LES SALES DE CULTIUS:	11
7. APARELLS DEL SERVEI: INSTRUCCIONS D'ÚS.	12
7.1. CABINES DE FLUX LAMINAR:	13
PNT DE TREBALL A LES CABINES	15
7.1.1. CABINA FLUX LAMINAR	15
7.1.2. CABINA BIOSEGURETAT II (BIOIIA)	17
7.1.3. ÚS DE GERMICIDES A LES CABINES BIOII	18
7.2. INCUBADORS DE CO ₂ :	20
7.3. MICROSCOPIS I LUPES	21
7.5. BANYS:	24
7.6. TANC DE N ₂ LÍQUID (-196°C)	25
7.7. CAMBRA D' HIPÒXIA	26
8. CONTAMINACIÓ DELS CULTIUS	27
9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:	28
10. CONTROL DE MICOPLASMA:	29
11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:	29
12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:	31
13. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC	33
13.1 Exemple de com transportar lentivirus correctament:	34
14. SALA 3.16 PER LA MANIPULACIÓ DE MOSTRES BIOLÒGIQUES DERIVADES DE PACIENTS	35
15. SANCIONS	35
16. CITACIÓ A LES PUBLICACIONS	35
17. TARIFACIÓ	35



Universitat de Lleida
Serveis Científicotècnics
Laboratori de Cultius
Cel·lulars

**DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE CULTIUS
CEL·LULARS**

BIBLIOGRAFIA	36
ANNEX 1. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris	37



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), conegui la normativa i forma adequada de treballar al servei.

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 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 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 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
Personal Tècnic	Rosa Vaquera	despatx -1.18 Bio II	rosa.vaquera@udl.cat	3758/12953



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 o superior 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 putativament infectat s'ha de comprovar els requeriments de Bioseguretat de l'AB present o possible al cultiu (en cas de dubte podeu consultar pàgines oficials com el RD 664/1997 (<https://www.boe.es/eli/es/rd/1997/05/12/664/dof/spa/pdf>) o altres com <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment.html> o al web: <https://www.insst.es/databio-fichas-de-agentes-biologicos> on especifica el nivell de bioseguretat necessari pel treball amb aquelles cèl·lules. Totes les cèl·lules humanes o de primats son agents biològics de com a mínim nivell 2 de risc i per tant requereixen ser manipulades en campanes de bioseguretat.

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 crioconservació cel·lular amb tancs de Nitrogen líquid.



1. **Lab -1.3:** Laboratori per treballar amb Línies estables.
2. **Lab 1.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire independent amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb Línies estables.
3. **Lab 2.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb cultius Primaris.
4. **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.
5. **Lab 3.9:** Laboratori amb pressió positiva i circulació d'aire amb entrada d'aire filtrat amb HEPA pel treball amb cultius Primaris
6. **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.
7. **Lab 4.11:** Laboratori de dissecció.

EQUIPAMENT DEL SERVEI:

L'SCT-CC compta amb:

17 INCUBADORS DE CO ₂	17 CAMPANES DE FLUX LAMINAR	7 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			

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:



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 patogènics 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 influença, 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 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 hàmmsters 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 *etal.* 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.



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. Es recomana portar pantaló llarg i sabata tancada.
5. 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.
6. 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>
7. No es pot tocar amb els guants de treball posats la resta del laboratori ni la porta.
8. La majoria d'equipaments de les sales s'han de reservar utilitzant el programa Supersaas de la web següent amb una antelació màxima de 24h i mínima de 15 minuts:
 - Cabines de flux laminar, campanes de Biodeguretat II, microscopis i lupes: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Campanes_flux_laminar
 - Hipòxia: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Reserva_Hipoxia_SCT_CC
 - Sala 3.16: https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Sala_3_16_SCT_CC_Autoritzats
9. Els usuaris amb cèl·lules vives al microscopi tenen preferència sobre els que tenen cèl·lules fixes.
10. 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
11. 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.
12. 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
13. **Els residus sòlids contaminats es llencen als contenidors de residu biològic** (un sota cada campana).
14. 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.

15. EL PAPER, PLÀSTIC, POREXPAN, etc. NETS i NO CONTAMINATS van als CONTENIDORS DE RECICLATGE (situats als passadissos).
16. 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).
17. 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.
18. Al finalitzar la feina dins la campana, s'ha de netejar el tub d'aspiració amb lleixiu –per neutralitzar possibles contaminants o el cultiu en medi i amb Propano-AF per eliminar el desinfectant restant del tub. **El buit** s'ha de tancar per evitar l'ús constant de la bomba.
19. 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.
20. **Mai s'ha de portar material de Primaris a Línies, ja que podria ser font de contaminació per a les línies cel·lulars.**
21. El trasllat de cèl·lules entre laboratoris no està permès excepte amb permís propi del servei.
22. 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.
23. 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.
24. **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)**



SOLUCIONS DESINFECTANTS DE LES SALES DE CULTIUS:

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.

Virkon: és un desinfectant d'ampli espectre. Consisteix en peroximonosulfat de potassi com a ingredient actiu. Deixar actuar 10 minuts com a mínim abans d'aclarir. Té activitat bactericida, fungicida, micobactericida, esporicida i virucida. Actualment només es troba a la sala 3.16



7. APARELLS DEL SERVEI: INSTRUCCIONS D'ÚS.

Contingut:

7.1 Cabines de Flux Laminar.....	12
7.2 Incubadors de CO ₂	20
7.3 Microscopis i Lupes.....	21
7.4 Centrifugues.....	23
7.5 Banys.....	24
7.6 Tancs de N ₂	Error! No s'ha definit el marcador.
7.7 Càmera d'Hipòxia.....	26



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 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).

Exemples d'ús de cabina de Bioseguretat 2:

- a. Producció de virus lentivirals, retrovirus, altres.
- b. Infecció de línies cel·lulars o cultius primaris amb partícules virals de risc 2.
- c. Cultius primaris i manipulació de cèl·lules humanes.
- d. 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 BIOLÒGICS	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.



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 deixant les reixetes d'extracció d'aire lliures per un bon manteniment de l'asèpsia dins la campana.
- c) Treballar amb bata de màniga llarga, mascareta higiènica (min.) i guants.

BONA PRAXIS DINS LA CABINA

- d) Separar la zona de treball en: zona neta, zona de treball i zona bruta.
- e) Introduir medis, mostres i tamps secs d'aigua del bany i ruixats amb solució alcohòlica prèviament.
- f) Treballar poc a poc i concentrats per evitar moviments bruscs que provoquin turbulències (→punt de contaminació) i producció d'aerosols.
- g) No passar els braços per sobre de les mostres obertes →punt de contaminació
- h) No introduir llibretes, calculadores, caixes de cartró o paper dins de la campana, →punt de contaminació.
- i) 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.
- j) Obrir el material estèril dins la campana. S'ha d'evitar la reinserció del material ja utilitzat al medi de cultiu o tampó.
- k) 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).
- l) Eviteu deixar els tacs 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, deixar-lo cap per amunt i lluny de l'àrea de treball, per no passar el braç per sobre.

RESIDUS

- m) Llençar el material que ha estat en contacte amb la mostra biològica al contenidor de residus biològics.



- n) 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.
- o) Tireu la pipeta Pasteur d'aspiració en el contenidor de residus biològic i desinfecteu el tub d'aspiració primer amb lleixiu al 70% o Virkon 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).
- p) 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 Virkon (tenint en compte les mesures de seguretat).



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 Virkon® fent servir la tècnica de l'escombrat.
- b) 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 *UNE EN ISO 374-5:2016* i la *ISO16604:2004* (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.

ACCIONS A REALITZAR - PROTOCOL dins la BIOIIA

- g) Repartiu l'espai de la campana en zona neta, zona de treball i zona bruta.
- h) El material no s'ha d'acumular en un punt, sinó que es repartirà per aconseguir un bona distribució del flux i evitar turbulències.
- i) Trebal·leu a poc a poc, concentrats evitant els moviments bruscs que podrien afavorir la producció d'aerosols.
- j) 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

- k) Llenceu el material petit contaminat (puntes, 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.

- l) 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

- m) 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 o Virkon, 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 (Virkon, PeraSafe...) demanant permís als responsables de la sala.
- n) Quan acabeu de treballar, retireu els reactius de la campana descontaminant-los exteriorment amb Etanol al 70% o Virkon®, descontamineu el material de treball i residus deixant-lo dins de la campana ruixat amb Etanol al 70% un temps d'actuació de 10 minuts. Un cop passat aquest temps, es llençaran els residus al seu contenidor i es retirarà el material de treball.
- o) 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.

7.1.3. ÚS DE GERMICIDES A LES CABINES BIOII

OBJECTIU

Regular l'ús de germicides a les cabines de Bioseguretat II

DEFINICIONS

Seguint les recomanacions de la normativa vigent:

Real Decret 486/2010, de 23 d'abril, sobre la protecció de la salut i la seguretat dels treballadors contra els riscos relacionats amb l'exposició a radiacions òptiques artificials.

Guia tècnica per a l'avaluació i prevenció dels riscos relacionats amb les radiacions òptiques artificials.

Regular l'ús de germicides en cabines BIOII

ÀMBIT D'APLICACIÓ

Totes les cabines BIOII del Servei de Cultius Cel·lulars de la Universitat de Lleida

PROCEDIMENT

- 1) Identificar a la porta de la sala que s'està utilitzant germicida per tal d'evitar l'entrada del personal



usuari



Reference No.

ISO 7010-W027

Referent

Warning; Optical radiation

Function

To warn of optical radiation

Image content

Star with 11 points with circle in centre

Hazard

Optical radiation (such as UV, visible radiation, IR)

Human behaviour that is intended to be caused after understanding the safety sign's meaning

Taking care to avoid injury to eyes and skin when in the vicinity of optical radiation

Additional information

Test data obtained according to ISO 9186-1 are not available from more than one country. Findings from national testing, however, showed that in one country the safety sign did not reach the criteria of acceptability. Consequently, a supplementary text sign shall be used to increase comprehension except when the safety sign is supplemented by manuals, instructions or training.

If necessary, a supplementary sign shall be used to give further information about the kind of optical radiation (e.g. UV, visible radiation, IR).

- 2) Al moment d'engegat i apagat, la persona manipuladora ha de tenir cobert el cos i portar unes ulleres de protecció ocular a radiació òptica
- 3) La porta de la cabina ha de romandre tancada durant l'ús del germicida
- 4) La persona manipuladora ha de responsabilitzar-se de que la cabina s'apaga al finalitzar l'ús i donar accés a la sala amb el cartell indicador



7.2. INCUBADORS 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 Virkon actuar durant 15 minuts. Ha d'informar-se al registre d'incidències 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 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.



7.3. MICROSCOPIS I LUPES

- **Instruccions generals:**

Si necessiteu usar el microscopi durant molta estona, reserveu-lo prèviament al programa. Les cèl·lules vives tenen preferència d'ús del microscopi vs. les fixades.

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.

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 treballat al formulari de registre present a la sala.
- 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.**
- Cal seguir instruccions específiques per a cada programari. Pregunteu a les 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.



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. S'ha d'eliminar el material trencat amb doble guant, aplicant lleixiu o Virkon, deixat actuar el desinfectant durant un mínim de 10 minuts i recollint els residus amb unes pinces. 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.



7.5. BANYS:

a. Definició:

Els banys d'aigua termostàtics es componen d'una cubeta on es diposita 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 destil·lada 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.
- Enguegueu 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 ampolles 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 ampolles 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.



7.6. TANC DE N₂ LÍQUID (-196°C)

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 esquitxades. 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 .
- 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 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 i registrarem el registre.



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 pre-establertes.

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.

S'ha de reservar cada cop que es necessiti i per la durada d'utilització. En cas d'usar-la per primer cop, contacteu amb el servei.

https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Reserva_Hipoxia_SCT_CC



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 bacteries 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 bacteries 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'òrgànuls filamentosos. La detecció de virus només es pot avaluar mitjançant tècniques moleculars o antigèniques.

8.1. Focus de contaminació

- a) 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.
- b) 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.
- c) 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.



- ➔ 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 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 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 (Ileixiu / Virkon).
 - La descontaminació del producte s'ha de fer durant 10 minuts per assegurar-nos de la seva correcta descontaminació.
 - 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. salivarum*, *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 aguanti 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 <https://www.irbllleida.org/es/servicios-cientificos-cultivos-celulares/> i lliurat via correu electrònic a sct.cultius@udl.cat 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 a exigir el trasllat de la línia cel·lular a la sala adequada de primaris.

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 i comunicar-ho als supervisors del laboratori del servei, en persona, per correu electrònic, trucada telefònica interna nº 2953 o 3758 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. Les 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 incubadores 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 incubadores de l'edifici estan apagats, o tenen fallada del CO ₂	Segellar els incubadores 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/



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 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

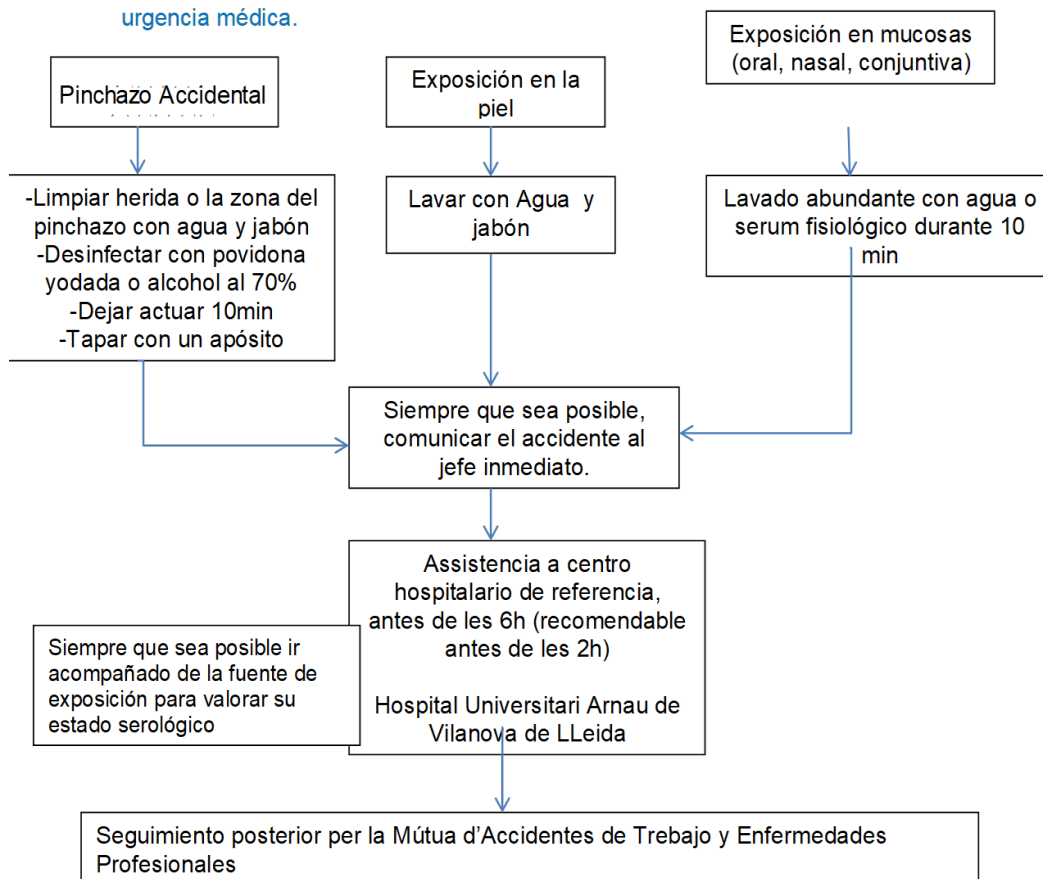
Els accidents amb material de risc biològic s'han de comunicar sempre a l'IP responsable de l'investigador i a el servei mèdic per seguir la traçabilitat d'una possible malaltia.

- **NORMA GENERAL:** La majoria dels agents de risc manipulats s'inactiven amb lleixiu (hipoclorit sòdic). 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 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 DEPENENT DE L'ADSCRIPCIÓ A EL IRB O UdL
 - NOTIFICAR ALS RESPONSABLES DEL SCT I OMLIR UN FORMULARI DE NOTIFICACIÓ D'ACCIDENTS.



ACTUACIÓN (Qué Hacer?)

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



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

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

IRBLleida: <http://www.quironprevencio.com/es>



13. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC

El transport de mostres de risc biològic és la ruta que fan les mostres des del lloc d'origen fins a les instal·lacions del IRBLleida per a la seva manipulació. El trasllat de mostres de risc biològic a les diferents sales de l'edifici també hauria de seguir aquestes estratègies seguint la norma UN3373:

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.

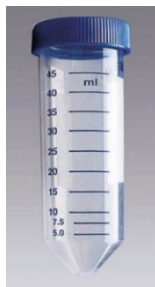
En mostres líquides:

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:





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 sobre). 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.



14. SALA 3.16 PER LA MANIPULACIÓ DE MOSTRES BIOLÒGIQUES DERIVADES DE PACIENTS

Per poder entrar a la sala 3.16 per la manipulació de mostres biològiques derivades de pacients es requereix una formació específica impartida pel SCT-CC. Prèviament s'haurà d'haver realitzat la formació general de cultius, també impartida pel SCT-CC

Per poder entrar-hi a treballar, el protocol haurà d'haver estat acceptat pel Comitè de Bioseguretat (comitebioseguretat@irbllleida.cat), qui s'encarregarà d'informar-ne al SCT-CC. La plantilla amb la qual s'enviarà el protocol es troba a la direcció següent: <https://www.irbllleida.org/ca/sobre-nosaltres/comites-i-comissions/>

15. SANCIONS

El SCT-CC de la UdL vol implementar un sistema de faltes i sancions que asseguri el compliment de la normativa de treball existent a les sales gestionades pel SCT-CC. El SCT-CC dona formació presencial específica a tots els usuaris segons el nivell de biocontenció que precisen. Els usuaris realitzen un examen que els acredita per ser usuaris de qualsevol sala (exceptuant la 3.16) i reben una “acreditació de capacitació de treball del SCT-CC”. En cas dels usuaris de la sala 3.16 (Biocontenció 2+), es realitza una formació específica seguida de la signatura d'una “declaració de responsabilitat”. En base a l'explicat, es considera necessari implementar un sistema de faltes i sancions que asseguri el compliment de les normes i garanteixi la seguretat dels usuaris, el personal del SCT-CC, personal de serveis present a Biomedicina i de la població general.

Aquestes sancions seran prèviament acordades per la Comissió de Recerca i Consell de Govern

16. 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 Scientific & technical Service, Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain, o The cell culture experiments were performed in the Cell Culture Scientific & technical Service from Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.

17. 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:

<https://www.recercatransferencia.udl.cat/ca/transferencia/serveis-cientificotecnicos/serveis/laboratori-de-cultius-celulars/>



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



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.



Universitat de Lleida
Serveis Cientificotècnics
Laboratori de Cultius
Cel·lulars

DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE CULTIUS
CEL·LULARS

SERVEI CIENTIFICOTÈCNIC CULTIUS CEL·LULARS

**DIRECTRIUS DE
FUNCIONAMENT DE LA SALA
3.16 PER LA MANIPULACIÓ
DE MOSTRES BIOLÒGIQUES
DERIVADES DE PACIENTS**

DOCUMENT: DC-005
DATA: 26/09/2022
REVISIÓ: 5



1. INTRODUCCIÓ

La sala 3.16 del SCT-CC es troba situada a la tercera planta de l'edifici de Biomedicina. Està equipada amb pressió negativa, fet que garanteix unes mesures de biocontenció superiors a les d'altres sales gestionades pel SCT-CC.

En relació al material manipulat a aquestes instal·lacions, establim que es restringeixi a mostres biològiques de potencial infecció desconegut o infectades amb agents infecciosos que requereixin nivell de biocontenció 2. Així mateix, les instal·lacions serviran per la producció i amplificació de qualsevol agent infecció de nivell 2 de biocontenció (incloent virus de laboratori utilitzats rutinàriament en recerca).

El SCT-CC assumeix la gestió de la sala 3.16 sota càrrec del Comitè de Bioseguretat de l'IRBLleida. Aquest comitè es fa responsable de revisar i avaluar els protocols i manipuladors que accediran a la sala i de comunicar al SCT-CC la decisió així com el protocol i tipus de mostra, dels manipuladors autoritzats.

OBJECTIU:

Donar a conèixer l'estructura i característiques del laboratori 3.16 del SCT-CC, les normes bàsiques de treball i d'ús dels aparells, així com les persones responsables a qui adreçar-se en cas d'avaries, contaminacions, accidents o suggeriments.

2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:

Aquestes directrius seran d'aplicació a la sala 3.16 de Cultius cel·lulars de la UdL-IRBLleida i als seus usuaris/manipuladors i els seus responsables/Investigadors principals.

3. PERSONAL AUTORITZAT

A la sala 3.16 només hi entrarà personal autoritzat que hagi estat aprovat pel comitè de seguretat de l'IRB Lleida.

Només es permetrà l'accés a investigadors amb un mínim de 180h d'experiència de treball a un laboratori d'àmbit biomèdic o similar.

En cap cas es podran realitzar treballs dirigits a cultivar, amplificar o purificar agents biològics de grup de risc superiors al nivell 2 de bioseguretat (*).

(*). En cas de dubte, consultar a:

<https://www.boe.es/doue/2019/279/L00054-00079.pdf>

<https://my.absa.org/tiki-index.php?page=Riskgroups>

https://www.hsa.ie/eng/topics/biological_agents/biological_agents_introduction/classification_of_biological_agents/final_statement_covid_19.pdf%EF%BB%BF

Procés d'autorització:

El comitè de Bioseguretat autoritzarà els procediments i els manipuladors usuaris de la sala. Per tal de conèixer els seus protocols i autoritzar o no la seva tasca, s'haurà d'omplir i enviar al comitè un correu-e (comitebioseguretat@irblleida.cat) amb la plantilla de sol·licitud de treball amb agents biològics de risc 2. Un cop autoritzat el protocol i l'investigador, s'hauran d'enviar al SCT-CC les següents fitxes:

- (i) fitxa de grup omplerta per l'investigador principal (IP)/responsable del manipulador
- (ii) fitxa d'usuari/manipulador.



A la **Fitxa de grup** el responsable o IP comunica el tipus de mostres que seran manipulades, la seva procedència i les tècniques/protocols que seran realitzades.

El comitè de Bioseguretat comunicarà a l'IP i al SCT-CC l'autorització pel tipus de mostres i tècniques proposades.

Fitxa Usuari/manipulador proporcionada pel SCT-CC on s'establirà informació relativa a l'usuari i la seva relació amb un IP/responsable determinat.

El primer dia que els nous usuaris entrin a la sala, els tècnics del servei els faran una explicació de les directrius del servei i normativa de la sala, així mateix els nous usuaris hauran d'acreditar haver entès i acceptar el reglament del servei 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 aquest. Així mateix se'ls atorgarà un **certificat d'autorització** i es firmarà una **declaració de responsabilitat**.

4. NORMES DEL LABORATORI

1. Al laboratori està prohibit menjar, beure, fumar, mastegar xiclet, maquillar-se, manipular lents de contacte i emmagatzemar aliments o begudes. Així com l'ús o manipulació d'objectes personals com el mòbils o auriculars.
2. És obligatori portar pantalons llargs i sabata tancada.
3. El laboratori es mantindrà ordenat, net i lliure de materials no relacionats amb la feina.
4. La cabina s'ha de reservar usant la web següent amb una antelació màxima de 24h i mínima de 15 minuts:
https://www.supersaas.es/schedule/SCT_CC/Sala_3_16_SCT_CC_Autoritzats
5. **EPIS de treball:** Per entrar a les sala 3.16 s'usarà una bata de cotó exclusiva per la sala, doble guant (un dels quals de nitril complint la norma *EN ISO 374-5:2016 Mercado de guantes que protejan frente a virus, bacterias y hongos*) mascareta FFP2, peücs, gorra, bata impermeable, ulleres o visera protectora que es col·locaran a la pre-sala abans d'entrar.
6. Les superfícies de treball es desinfectaran a l'inici i al final de cada ús amb Propano-AF (barreja Isopropanol i Etanol).
7. Eviteu la introducció de llibretes, calculadores, caixes de cartró o paper dins de la campana, poden ser font de contaminació.



8. RETIRADA D'EPIs:

- a) Un cop es finalitza de treballar i un cop s'han retirat els guants de manipulació, l'usuari es rentarà les mans enguantades amb aigua i sabó, a continuació es traslladarà a la zona neta marcada al terra tot retirant-se per aquest ordre: els peücs, la gorra, les ulleres, la bata impermeable i els guants. Les ulleres o pantalla facial es netejarà amb alcohol, aigua i sabó o lleixiu diluït i s'introduirà en una bossa de plàstic segellable i nominal. Abans de sortir de la sala, l'usuari es vestirà amb un parell de guants i just a l'avantsala, es retirarà la mascareta FFP2 agafant-la per les cintes o gomes, evitant en tot moment tocar la part exterior i la introduirà a una altra bossa segellable per finalment tirar-la a un contenidor de risc biològic present a l'avantsala. Si la mascareta porta una R marcada també es pot esterilitzar introduint-la a un forn a 70°C durant 30'. Finalment es descartarà el segon parell de guants i es rentaran o desinfectaran curosament les mans i els canells.
- b) Un cop a la pre-sala l'usuari es canviarà la bata de cotó específica de la sala 3.16, per la seva bata d'ús a la resta de l'edifici. Aquesta bata es netejarà setmanalment.

9. No es pot tocar amb els guants que manipulem les mostres la resta del laboratori ni el seu equipament.

10. Residus sòlids: S'introdueixen dins les bosses d'un sol ús de l'interior de la campana. En el cas de tubs s'han de tancar prèviament de forma hermètica. Un cop finalitzada la feina, la bossa es segellarà i descartarà al contenidor de residus biològics. Si el material és massa gran s'inactivarà amb lleixiu al 20% si hi ha poca càrrega de matèria orgànica o PeraSafe®, durant 10 minuts tant interiorment com exteriorment, i es descartarà el material sòlid al contenidor de residus biològics.

11. Residus Líquids: En el cas dels pots d'aspiració de residus líquids, primer es neutralitzaran amb lleixiu. Si el pot s'emplena del tot, es buidarà el pot a la garrafa de residus citotòxics líquids (al costat de la pica). Al finalitzar la feina dins la campana, s'ha de netejar el tub d'aspiració amb lleixiu per neutralitzar possibles contaminants o el cultiu en medi i amb Propano-AF per eliminar el desinfectant restant del tub. El buit s'ha de tancar per evitar l'ús constant de la bomba.

12. Els residus que continguin fàrmacs o substàncies citotòxiques es descarten al contenidor blau (un per sala).

13. Si els contenidors de residus estan a la seva màxima capacitat els usuaris amb guants nets els poden tancar adequadament i agafar-ne un de buit disponible dins la sala.

14. És obligatori l'ús de puntes amb filtre.

15. És recomanable evitar qualsevol material punxant. En cas contrari, es rebutgen al contenidor groc de dins la campana.

16. Els protocols a treballar hauran de minimitzar o evitar la formació d'aerosols, en cas inevitable s'utilitzaran metodologies que n'evitin la seva dispersió

17. S'utilitzaran tubs amb tap de rosca evitant els de pressió especialment per vortejar o centrifugar.

18. És obligatori utilitzar les tapes anti-aerosols durant les centrifugacions.



19. Està prohibit vessar líquids al bany termostàtic de la sala 3.16. Si accidentalment passés, avisar els tècnics del servei. S'haurà de comprovar el risc biològic del vessament, si s'ha d'inactivar el producte caigut al bany i netejar el bany.
20. És responsabilitat del darrer usuari de la sala apagar el **bany** al final del seu ús.
21. És obligatori reportar al supervisor de la sala tots els vessaments, accidents i exposicions obertes o potencials a materials infecciosos.
22. És obligatori mantenir un registre escrit de totes aquestes situacions a través del registre d'incidències present a dins el laboratori.
23. Les BioIIA **NO** són cabines extractores de fums ni tenen filtres de carbó actiu pel que l'ús de productes tòxics volàtils està desaconsellat. El seu ús en cas d'absoluta necessitat i tenint en compte el risc biològic que puguin tenir les mostres, es valorarà amb el comitè de Bioseguretat. 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.



5. EQUIPAMENT DE LA SALA:

Contingut:

7.1 Cabines de Bioseguretat IIA	6
7.2 Centrífuga	10
7.3 Incubadors de CO ₂	11
7.4 Microscopi invertit de fluorescència.....	12
7.5 Bany termostàtic amb pellets	12

7.1 Equipament de la sala i instruccions d'ús: 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. A l'interior de la cabina es produeix una depressió amb pressió negativa evitant la dispersió de patògens a la resta de la sala. És la més adequada per al treball amb agents de risc 2.

El SARS-CoV-2 és un patògen de grup de risc 3, per tant no es podrà cultivar ni aïllar. Però el risc associat a la manipulació de la mostra es considera de nivell 2 fent plausible el seu treball amb NCB-2.

* 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)

		CLASE I	CLASE II TIPO A	CLASE II TIPO B	CLASE III
AGENTES BIOLÒGICS	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.



Universitat de Lleida
Serveis Científicotècnics
Laboratori de Cultius
Cel·lulars

**DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT
DELS LABORATORIS DE CULTIUS
CEL·LULARS**

Ref: NTP 233: Cabines de seguretat biològica

ABANS DE COMENÇAR VISUALITZEU AQUESTS VÍDEOS:

Col·locació i retirada d'EPIs en una sala de Contenció Biològica:

<https://www.youtube.com/watch?v=W07nqrUF3IU>

Funcionament d'una BioIIA per protegir l'usuari:

<https://www.youtube.com/watch?v=96-aZLom340>

Com treballar de forma segura en una BioIIA:

<https://www.youtube.com/watch?v=1nDjLcsYbAQ>

Tècnica de l'escombrat: <https://www.youtube.com/watch?v=hgERAfHP6nk>

Vídeo demostratiu de com treure's els guants.

<https://www.youtube.com/watch?v=pM8SEp5cLo8>



Mostres i protocols de treball que requereixen ser manipulades a la sala 3.16:

1. Manipulació de mostres biològiques de potencial infecció desconegut i els seus derivats.
2. Manipulació de mostres biològiques infectades per agents que requereixin un nivell de biocontenció II (segons la classificació de risc biològic de l'agent infecció o el protocol que es realitzarà amb aquest).
3. Empaquetament i amplificació de partícules virals classificades en nivell II de biocontenció (incloent les dedicades a la sobreexpressió d'oncogens, la inhibició de gens supressors de tumors i altres).
4. Infecció de cultius cel·lulars amb partícules virals creades per la sobreexpressió d'oncogens o la inhibició de gens supressors (les línies creades han de mantenir-se durant un mínim de 1 passe a la sala 3.16)
5. Establiment de línies cel·lulars a partir de mostres biològiques de potencial infecció desconegut.

PNT de treball a la BioIIA:

OPERACIONS PREVIES
<ol style="list-style-type: none">1. PREPARACIÓ DE MATERIAL2. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS DESINFECTANTS3. PREPARACIÓ DE ZONA DE DESCONTAMINACIÓ DE MATERIAL AMB DESINFECTANT4. COL·LOCACIÓ DELS EPIS
<ol style="list-style-type: none">a) Abans de fer cap procediment, es netejaran les superfícies de la campana amb la solució alcohòlica present a la sala del 70% min. en alcohol fent servir la tècnica de l'escombrat.b) S'engegarà el flux i s'introduirà tot el material a la campana. Fins que el flux no ha re-circulat i porta el cabal adequat no és segur treballar a dins la campana.c) 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 UNE EN ISO374-5:2016 (substituta de la EN374:2003 especificació virus o 374-5) i la ISO16604:2004. 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 tancar les reixes d'extracció de l'aire per permetre la bona seguretat de l'usuari.d) 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.e) 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.



ACCIONS A REALITZAR - PROTOCOL dins la BIOIIA

- f) Repartiu l'espai de la campana en zona neta, zona de treball i zona bruta.
- g) El material no s'ha d'acumular en un punt, sinó que es repartirà per aconseguir un bona distribució del flux i evitar turbulències.
- h) Treballeu a poc a poc, concentrats evitant els moviments bruscs que podrien afavorir la producció d'aerosols.

RESIDUS

- i) Llenceu el material petit contaminat (puntes, tubs...) a la 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.
- j) A l'acabar, agafeu les pipetes llargues, reintroduïu-les en els seus embolcalls originals i llenceu-les al contenidor de residus biològics.

DESCONTAMINACIÓ I NETEJA DE LA CAMPANA I ÀREA DE TREBALL

- k) 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 (Lleixiu, Virkon...) demanant permís als responsables de la sala.
- l) Quan acabeu de treballar, retireu els reactius de la campana descontaminant-los exteriorment amb Etanol al 70% o lleixiu, descontamineu el material de treball i residus deixant-lo dins de la campana ruixat amb Etanol al 70%. Al finalitzar, es llençaran els residus al seu contenidor i es retirarà el material de treball.
- m) Qualsevol material que hagueu d'entrar i/o sortir de la campana (ex. Buckets de la centrifuga, s'ha de netejar exteriorment amb un paper impregnat amb solució etanolitzada abans d'introduir-lo a la campana i abans de treure'l.

VESSAMENTS

- n) En cas de vessament de líquid amb material biològic dins de les cabines, seguir el protocol 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 sabó i aigua.

En acabar de treballar, s'ha de recollir tot el material utilitzat i deixar les campanes buides, netes i desinfectades després del seu ús.



7.2 Equipament de la sala i instruccions d'ús: Centrífuga.

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, separació de fases, etc.

Centrífuga Eppendorf 5810R rotor A-6-42 amb buckets per tubs de 15 i 50ml amb tapa antiaerosols

Instruccions d'ús:

- Traieu els adaptadors de tubs de les cistelles (buckets) de la centrífuga, netegeu-les amb un paper impregnat amb etanol o lleixiu diluït i obriu-les a la campana de seguretat BioIIA.
- Inseriu els tubs tancats hermèticament als adaptadors. Aquesta centrífuga admet tubs de 15ml i de 50ml sense faldó.
- Tanqueu les cistelles amb la tapa antiaerosol i amb els seus corresponents tubs per fer balança, netegeu-les exteriorment amb etanol i torneu a inserir-la a la centrífuga.
- Utilitzeu el programa adequat.
- Un cop acabada la centrifugació i oberta la centrífuga, cal portar la cistella tancada a la campana BioIIA. S'ha d'obrir dins de la cabina, retirar els tubs i tornar a portar la cistella a la centrífuga comprovant prèviament que no s'hagi produït cap vessament al seu interior.
- Si es produeix un vessament al rotor de la centrífuga, l'usuari ha d'esperar per obrir la centrífuga i així, evitar que es dispersin els aerosols produïts. Seguiu el protocol present a dins del Kit antivessaments present a la sala. S'ha d'eliminar el material trencat amb doble guant, desinfectant-lo amb lleixiu, deixar-lo dins de la campana de BioIIA i que actui 10-15 minuts. Tot el material s'ha de neutralitzar i la centrífuga, el rotor, la cistella i els adaptadors de tubs netejar i desinfectar abans de tornar-los a utilitzar.



7.3 Equipament de la sala i instruccions d'ús: Incubadors de CO₂

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%) (La majoria del CO₂ present a la sang es troba en forma de bicarbonat (HCO₃⁻) aquest actua com un 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 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.

Instruccions d'ús:

1. Només es podran cultivar cultius primaris humans que a priori no siguin positius per cap agent biològic de grup de risc ≥ 2 .
2. Les plaques es dipositaran a l'incubador amb safates, per facilitar el dipòsit de plaques a les prestatgeries i per evitar vessaments a l'incubador. Les safates són propietat de cada grup. Les safates són obligatòries.
3. 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.
4. 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. Es recomana l'ús de flascons en lloc de plaques de petri.
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, s'ha d'absorbir amb paper impregnat amb lleixiu i, finalment, desinfectar-ho amb solució alcohòlica, segueix les instruccions del protocol ubicat a l'interior del Kit de vessaments present a la sala.
6. Quan el vessament es trobi a l'interior de l'incubador, s'aplicaria el mateix procediment que al punt 4, i la comunicació de la incidència al responsable del laboratori és absolutament obligatòria.
7. Si un dels cultius es contamina, haurà de ser eliminat immediatament de l'incubador i neutralitzat amb lleixiu diluït. Cal anotar-ho al registre de contaminació present al laboratori.
8. Els incubadors es calibren automàticament diàriament. Mentre l'incubador s'està calibrant NO es pot obrir la porta ja que el desestabilitzaríem. Esperarem que l'incubador torni al seu estat de repòs per evitar realitzar una calibració errònia falsejant la configuració de les constants.



7.4 Equipament de la sala i instruccions d'ús: Microscopis invertits de fluorescència

Aquests equips són microscopis que compten amb una llum que emet 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.

Instruccions d'ús:

- La fluorescència del microscopi del laboratori 3.16 funciona amb una bombeta de mercuri. Per allargar la seva vida útil, 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-la. Per gestionar el manteniment de la làmpada de fluorescència, els usuaris han de registrar el nombre d'hores que la bombeta ha treballat al formulari de registre present a la Sala.
- Les càmeres associades es poden utilitzar per fer fotos dels experiments realitzats a la sala de cultiu. Qualsevol usuari amb cèl·lules vives tindrà prioritat davant de qualsevol usuari de cèl·lules fixes.
- Cal seguir instruccions específiques per a cada programari. Pregunteu al responsable del laboratori en cas de dubte.

7.5 Equipament de la sala i instruccions d'ús: Bany termostàtic amb pellets

El bany termostàtic es componen d'una cubeta on normalment es diposita els pellets o l'aigua.

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

En el cas del laboratori 3.16 el bany termostàtic s'omple mitjançant unes "beads" metàl·liques que proporciona certes avantatges respecte els banys d'aigua com és evitar el creixement de microorganismes que puguin contaminar el material. També en cas de vessament d'un agent biològic de risc, al no haver-hi altres líquids facilitarà la seva neutralització i contenció.

1. Encendre el bany pre-programat a 37°C.
2. Introduir els medis o mostres a escalfar.
3. Retirar el material un cop ha arribat a la temperatura indicada desinfectant el material, tubs, ampolles, etc, ruixant-ho amb solució etanolitzada abans d'introduir el material a la cabina de bioseguretat.
4. En el cas que es produeixi un vessament de substàncies amb risc biològic, s'haurà de desinfectar el bany, submergint les beads en Virkon® durant 10 minuts i esbandint-les posteriorment, netejar el bany primer amb lleixiu diluït i etanol i a continuació fer un rentat amb aigua i sabó. Les beads un cop esterilitzades s'assecaran a un forn a temperatura d'entre 68°C i 250°C. No es poden autoclavar.

Per un manteniment habitual de les beads, es rentaran un cop al mes amb aigua i sabó, posteriorment es submergiran amb solució etanolitzada i es deixaran assecar a un forn d'entre 68 i 250°C.



5. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:

- Qualsevol incident ocorregut, s'ha anotar al registre d'incidències i comunicar-ho ràpidament als responsables de la sala, en persona, per correu electrònic i/o 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 del servei 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 incubadores d'un únic laboratori estan apagats, o presenten una fallada del CO ₂ o temperatura	Intentar restablir el sistema elèctric, si no se soluciona, moure totes les plaques a un altre incubador d'una altra sala, transportant-les en màxima seguretat ben segellades amb parafilm dins de recipients estancs amb paper adsorvent per si hi ha algun vessament i alliberant un incubador exclusiu d'una altra sala de primaris per aquestes mostres. Si les mostres no es poden moure, es convenient segellar l'incubador i buscar ajuda tècnica.
Tots els incubadores de l'edifici estan apagats, o tenen fallada del CO ₂	Segellar els incubadores i evitar que ningú els obri per mantenir els seus paràmetres. Buscar ajuda tècnica.
Altres equips (Cabina BioIIA, bany, centrifuga, microscopi,...) fallen	Si cap de les dues BioIIA funciona no es podrà treballar. S'haurà de tancar totes les mostres el més ràpid possible, desinfectar totes les superfícies i materials i parar de treballar. Si el bany falla, s'intentarà buscar un bany alternatiu que pugui entrar a la sala. Si falla la centrifuga es buscarà a l'edifici una altra centrifuga amb tapa antiaerosol per poder finalitzar la tasca que es dugués a terme. El transport de les mostres sempre serà seguint la normativa establerta.
Fallada elèctrica a la sala o l'edifici.	Incidència urgent a la OTI via web http://www.udl.cat/ca/serveis/oti/formulari/salut/

6. 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-la 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.

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

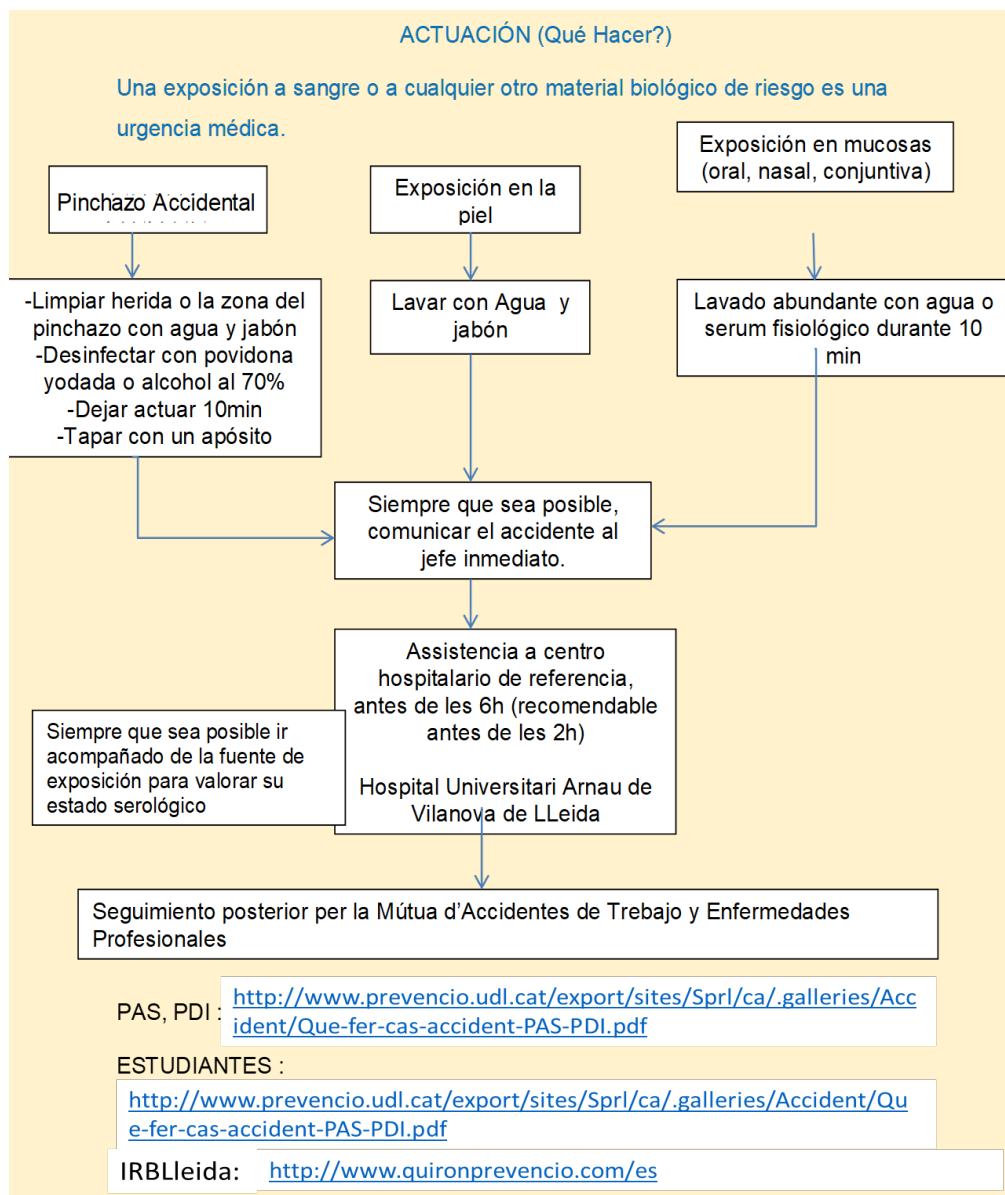
Desinfectar amb etanol al 70% l'àrea afectada.



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

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 (SARS-Cov-2, 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 al 70%.
- **SOBRE LA PELL, ROBA O SUPERFÍCIES NO RESISTENTS:**
 - Primer: treure's la roba/ EPIs contaminades i llençar-ho.
 - Rentar amb aigua corrent sense fregar la pell.
 - Aplicar sabó de mans i aclarir llargament amb aigua corrent.
 - Desinfectar amb etanol al 70%.
 - Si es tracta d'una ferida oberta rentar amb aigua i sabó i a 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 L'IRB O la UdL
 - NOTIFICAR ALS RESPONSABLES DEL SCT I OMLIR UN FORMULARI DE NOTIFICACIÓ D'ACCIDENTS.



7. TRANSPORT DE MOSTRES DE RISC BIOLÒGIC

El transport de mostres de risc biològic és la ruta que fan les mostres des del lloc d'origen fins a les instal·lacions del IRBLleida destinades a la seva manipulació. El trasllat de mostres de risc biològic a les diferents sales de l'edifici també ha de seguir aquestes estratègies seguint la norma **UN 2814/UN 2900** o **UN3373**:

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 ...

Mostres:



Contenidors Primaris:

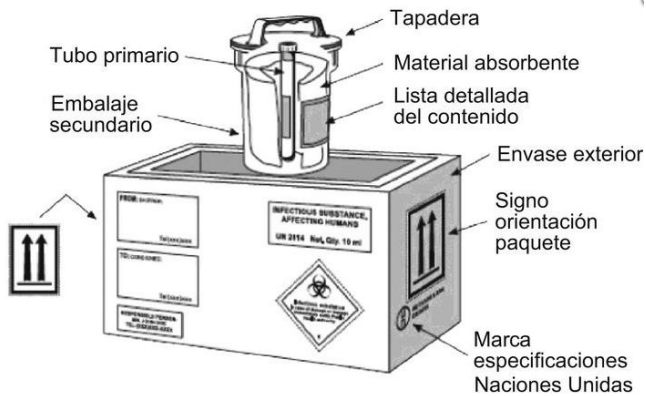


Contenidors secundaris:





Enviament reglat:



8. SANCIONS I AMONESTACIONS

El SCT-CC de la UdL vol implementar un sistema de faltes i sancions que asseguri el compliment de la normativa de treball existent a les sales gestionades pel SCT-CC. El SCT-CC dóna formació presencial específica a tots els usuaris segons el nivell de biocontenció que precisen. Els usuaris realitzen un examen que els acredita per ser usuaris de qualsevol sala (exceptuant la 3.16) i reben una “acreditació de capacitació de treball del SCT-CC”. En cas dels usuaris de la sala 3.16 (Biocontenció 2+), es realitza una formació específica seguida de la signatura d’una “declaració de responsabilitat”. En base a l’explicat, es considera necessari implementar un sistema de faltes i sancions que asseguri el compliment de les normes i garanteixi la seguretat dels usuaris, el personal del SCT-CC, personal de serveis present a Biomedicina i de la població general.

Aquestes sancions seran prèviament acordades per la Comissió de Recerca i Consell de Govern

9. Agraïments

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 Scientific & technical Service, Universitat de Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.*

10. 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-cientific-tecnics/.galleries/2022/Tarifas-SCT-2022-amb-index.pdf>