

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 1 de 16

## Contingut

1. OBJECTIU: .....	2
2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:.....	2
3. INTRODUCCIÓ.....	2
4. PERSONAL AUTORITZAT .....	3
4.1. Dades dels responsables.....	3
5. DESCRIPCIÓ DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS: .....	3
5.1. Laboratoris de Primaris.....	3
5.2. Laboratoris de Línies .....	3
6. NORMES BÀSIQUES DEL LABORATORI .....	4
7. INSTRUCCIONS D'ÚS DELS APARELLS: .....	5
7.1. CABINES DE FLUX LAMINAR: .....	5
7.2. INCUBADORS DE CO <sub>2</sub> .....	9
7.3. MICROSCOPIS I LUPES.....	10
7.4. CENTRÍFUGUES:.....	11
7.5. BANYS: .....	12
7.5.1. TANC DE N <sub>2</sub> LÍQUID (-196°C): .....	12
7.6. CÀMERA D'HIPÒXIA .....	12
8. CONTAMINACIÓ DE CULTIUS.....	12
9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ: .....	14
10. CONTROL DE Micoplasma A LÍNIES:.....	14
11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES: .....	15
12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:.....	15
ANNEX I. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris .....	16

 	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 2 de 16

## 1. OBJECTIU:

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 adreçar-se en cas d'avaries, contaminacions, accidents o suggeriments.

## 2. ÀMBIT D'APLICACIÓ:

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

## 3. INTRODUCCIÓ

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


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

El **Servei de cultius cel·lulars (SCT-CC)** és un servei de tipus II, adscrit al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques (CMB) de la UdL i dona servei a tots els usuaris dels diferents departaments de la Universitat i també a usuaris externs.

L'SCT-CC es troba ubicat a l'**edifici de Biomedicina (IRBLleida)** i compta amb **7 laboratoris** i una **zona de crioconservació** cel·lular amb tancs de nitrogen líquid:

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

Els coordinadors i assessors del SCT són la Judit Ribas i en Serafí Cambray. I els tècnics del servei són la Marta Rafel (IRB), com a tècnic superior responsable, i l'Iván Hidalgo (UdL), com a tècnic qualificat de suport.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 3 de 16

## 4. PERSONAL AUTORITZAT

Al laboratori de cultius cel·lulars **només hi entrarà el personal autoritzat.**

El primer dia d'entrar al servei, els nous usuaris ompliran una fitxa amb les seves dades i els tècnics del servei els faran una explicació de les directrius del servei, 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.


### 4.1. Dades dels responsables:

	Nom	Localització	e-mail	Extensió telf.
Coordinador i assessor científic	Serafi Cambray	Despatx 1.11 Biol	scambray@irbllleida.cat	2482
	Judit Ribas	Lab. b2.2	judit.ribas@mex.udl.cat	2936
Tècnic Responsable	Marta Rafel	Despatx 2.4 Bio. II	mrafel@irbllleida.cat	2953 12953
Tècnic qualificat de suport a temps parcial	Iván Hidalgo	Despatx 2.4 Bio. II	ivan.hidalgo@udl.cat	2953 12953

## 5. DESCRIPCIÓ DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS:



**5.1. Laboratoris de Primaris:** Destinats al treball amb cultius primaris, cèl·lules humanes i cèl·lules contaminades amb micoplasma o no testades.

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

	DOCUMENTS SCT-CC		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
DOC-CC-02	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 4 de 16

## 6. NORMES BÀSIQUES DEL LABORATORI

1. Al laboratori està **prohibit** menjar, beure, fumar, mastegar xiclet, maquillar-se, manipular lents de contacte i emmagatzemar aliments o begudes.
2. El laboratori es mantindrà **ordenat, net** i lliure de materials no relacionats amb el treball.
3. Per entrar a les sales de cultius s'ha de portar **bata neta de màniga llarga**, preferiblement bates exclusives pel treball al laboratori de cultius cel·lulars.
4. Les superfícies de treball es **desinfectaran al començament i al final** de cada ús amb etanol o "fagetriald" (tenint en consideració les mesures de seguretat) i després de tot vessament de material potencialment perillós (medi, cèl·lules, virus...).
5. Quan es treballa a la campana de flux laminar s'han de **ruixar amb etanol** mans i mànigues
6. **Eviteu** la introducció de **llibretes, calculadores, caixes de cartró** o fulls dins de la campana, poden ser font de contaminació.
7. S'han d'utilitzar **guants en tots els casos de manipulació de cèl·lules**. En el cas de la BioIIA s'utilitzarà doble guant.
8. Un cop utilitzats s'enretiraran de forma asèptica i a continuació es rentaran les mans. No s'ha de sortir del laboratori amb els guants posats.
9. S'ha d'**evitar el contacte dels guants de treball amb els aparells** del laboratori i el pom de la porta.
10. En acabar de treballar, s'ha de recollir tot el material utilitzat i **deixar les campanes buides, netes** i desinfectades després del seu ús.
11. Mentre no es treballi, **l'interior de les campanes ha d'estar buit**. En el cas de la Bio-II-A únicament es manté a dins el pot d'aspiració, un pot per pipetes llargues i un contenidor groc (per evitar els riscos que comporten els residus d'aquesta campana).
12. Tots **els materials, mostres** i cultius contaminats hauran de ser **descontaminats** abans d'eliminar-los. En el cas de cultius que s'han d'eliminar, es neutralitzaran primer amb lleixiu, s'aspirarà el medi neutralitzat i s'eliminarà la placa amb els residus sòlids.
13. **Els residus sòlids contaminats s'aboquen als contenidors negres** (un per a cada campana).
14. Els residus que continguin algun fàrmac o **citotòxic** es llençarà al contenidor **blau** (un per sala).
15. **EL PAPER I PLÀSTIC, POREXPAN**, etc. nets i **NO CONTAMINATS VAN ALS CONTENIDORS DE RECICLATGE (ubicats al passadís)**.
16. Si el contenidor negre, blau o groc que s'ha d'utilitzar està ple, qualsevol usuari pot tanca'l i agafar-ne un de nou (situat dins la sala). Pel cas dels residus líquids, primer s'han de neutralitzar amb lleixiu i després es poden buidar a la garrafa de residus citotòxics (al costat de la pica).
17. En el cas de la Bio-II-A, les puntes de pipeta, pasteurs, agulles, xeringues...s'aboquen al contenidor groc i les pipetes llargues al recipient amb aigua i sabó per a pipetes, que es troben dins la campana. Els líquids s'han d'aspirar tots a l'ampolla connectada al buit ubicada dins la campana.

 	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 5 de 16

18. Un cop finalitzat el treball, el **tub d'aspiració** s'ha de **netejar** amb lleixiu i etanol fins a neutralitzar els líquids contaminants o medis de cultiu (canvi de color del fenol-vermell del medi a transparent) aspirats i **tancar el buit** per evitar l'ús constant de la bomba.

19. No llençar líquids bruts al bany, si per accident en caigués contacteu als tècnics del servei.

El **bany** s'ha de **tancar** un cop finalitzat el seu ús. És important per evitar que quedi engegat, es cremi la resistència i pugui 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.**

## 7. INSTRUCCIONS D'ÚS DELS APARELLS:

Les instruccions bàsiques a seguir per a cada aparell són les següents:

### 7.1. CABINES DE FLUX LAMINAR:

#### a. Definició:

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

Segons el tipus de cabina protegirà:


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

#### b. Tipus de cabines:

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

Les cabines de flux laminar vertical asseguren una bona protecció del producte, i, segons el seu disseny, també una protecció parcial del manipulador.

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

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 6 de 16

\*Les campanes de flux laminar no es consideren campanes de bioseguretat. Les campanes de bioseguretat de tipus I són aquelles que protegeixen al 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
<b>AGENTES BIOLÓGICOS</b>	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)
<b>PRODUCTOS DE ALTA TOXICIDAD</b> 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.

### **7.1.1. Normes generals:**

Abans de començar a treballar:

1. Reserveu la campana el temps necessari per a realitzar l'experiment al **registre** (P-CC-04) penjat a cada campana on s'apunten els usuaris (és obligatori reservar el mateix dia).
2. Netegeu i desinfecteu la campana amb el desinfectant adient:

 	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 7 de 16



- Etanol al 70% (efecte immediat, s'ha d'eixugar a continuació. **No utilitzar en la mampara de metacrilat** ja que aquest no n'és resistent i la seva reacció provoca opacitat).
  - Fagetriald 0.5% (deixar actuar **10 minuts** abans d'eixugar. **ATENCIÓ:** Conté aldehids (com el formaldehid), aplicar-lo en absència de gent a la sala, produeix vapors tòxics. És bo *versus* els virus i les espores.
3. Col·loqueu tot el material fungible que hagueu d'utilitzar a dins sense apilar-lo, permetent que els UV arribin a tot arreu (prèviament ho haureu ruixat amb etanol, sobretot a la zona de les juntes). **Atenció:** Els UV de la campana són UVC, d'alta energia, germicides. Eviteu qualsevol contacte amb els ulls i la pell.
  4. Engegueu els UV i el flux uns 5-10 minuts abans de començar a treballar.
  5. Tanqueu els UV i engegueu el llum per començar a treballar.

En treballar a la campana:

1. Trebal·leu amb bata i guants (ruixeu les mànigues amb etanol abans de començar).
2. Poseu tot el material el més endins possible de la campana: en treballar, s'han de deixar lliures les reixetes de ventilació.
3. No passeu mai els braços per sobre la mostra.
4. Eviteu deixar els taps de les ampolles i tubs a la superfície de la campana (posar-los i treure'ls cada cop aguantant-los amb la mà). Si és necessari deixar el tap a la superfície, deixar-lo cara amunt i allunyat de la zona de treball, per no passar el braç per sobre.
5. Aneu amb compte de no tocar amb els guants el material estèril que entrarà amb contacte amb les cèl·lules. En cas de dubte, descarteu el material o identifiqueu la placa i feu-ne un seguiment.
6. Obriu el material d'un sol ús dins la campana. Si el material estèril entra en contacte accidentalment amb material no estèril, no retornar-lo dins del medi de cultiu o tampons. És preferible llençar la pipeta cada cop que s'ha finalitzat l'ús i agafar-ne una nova, que no deixar-la dins de l'ampolla.
7. Per aspirar líquids, engegueu la bomba d'aspiració i connectar una pipeta Pasteur al tub (si s'han d'aspirar diferents líquids és bo afegir-hi una punta de pipeta groga i anar canviant-la per no haver de canviar cada cop la pipeta pasteur).
8. Llenceu el material que ha entrat en contacte amb la mostra biològica al contenidor negre/blau de residus.
9. Descarteu la resta de material net (PLÀSTIC, PAPER, CARTRÓ, POREXPAN) a les papereres de reciclatge.
10. Abans d'eliminar les cèl·lules, deixeu-les 15 min en lleixiu diluït al 70%, després aspireu la part líquida i descarteu la placa al contenidor negre. No llenceu residus citotòxics per la pica.
11. No traslladeu plaques amb cultius d'un laboratori de cultius a un altre, excepte per causes majors.

En acabar de treballar:

- Recolliu i desinfecteu amb etanol diluït al 70% tot el material utilitzat, assegureu-vos que la superfície de la campana queda neta de residus sòlids i líquids i deixeu la campana buida.

 	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 8 de 16

- Llenceu la pipeta Pasteur d'aspiració al contenidor de residus negre/blau i desinfecteu el tub d'aspiració primer amb lleixiu al 70% i després amb etanol 70% **fins que no quedin restes de medi de cultiu al tub i el dipòsit de residus líquids viri de color roig-fenol a neutre (decolorat).**
- Netegeu la **superfície i desinfecteu-la** amb etanol o “fagetriald” (tenint en compte les mesures de precaució).
- Deixeu els UV funcionant durant 5-10 minuts (la majoria de campanes es poden programar durant 20 minuts, prement el botó amb la fletxa en direcció a dalt, un cop s'han encès els UV).

### 7.1.2. **Bio-II-A:**


#### Activitats generals que es realitzen a la campana:

- Producció de virus.
- Infecció de línies cel·lulars o cultius primaris.
- Cultius primaris de cèl·lules humanes (potencials transmissores de malalties víriques.)

#### Normes de treball:

- En engegar els UV no s'ha d'extreure la tapa frontal.
- Treballu amb bata de màniga llarga ajustada als canells i amb doble guant.
- No apliqueu etanol als guants interiors abans de posar el segon parell (l'etanol els permeabilitza).
- Llenceu el material petit contaminat (puntes, eppendorfs, pipetes pasteur, guants externs...) al contenidor de residus groc de dins de la campana.
- Llenceu les pipetes llargues al vas de precipitats de dins de la campana.
- Deixeu la resta de material contaminat dins la campana ruixat amb etanol al 70% i amb els UV uns 10 minuts per tal de descontaminar-lo i després llenceu-lo al contenidor negre/blau de residus.
- Els líquids s'han d'aspirar i queden recollits en un recipient que conté **lleixiu al 70%**. Només buidarem el recipient quan el medi estigui neutralitzat. Sabrem que les mostres biològiques s'han inactivat utilitzant lleixiu. Si el color roig-fenol del medi vira a incolor és un indicador fiable per determinar si la solució ha quedat neutralitzada, per tant,:
  - Medi groc-blanc: lleixiu completament actiu, podem descartar el líquid.
  - Medi taronja-rosat: cal afegir més lleixiu. Cal esperar un mínim de 10 minuts per a manipular el recipient d'aspiració fora de la campana.
- Per tant, en acabar de treballar s'ha de desinfectar amb **lleixiu al 70%** el tub d'aspiració fins que el líquid del recipient estigui neutralitzat i després posar-hi **etanol al 70%** perquè no quedin restes de lleixiu al tub.
- Per eliminar cèl·lules:** poseu lleixiu al 70%, deixeu actuar el lleixiu durant 15 minuts, aspireu el líquid, destapeu la placa i deixeu els UV 15 min. Finalment elimineu el material i el residu sòlid al contenidor negre.
- Les mostres biològiques es poden treure de la campana un cop s'ha lisat o fixat el cultiu. La superfície externa dels tubs, medis, plaques... que continguin les mostres s'ha de descontaminar



	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 9 de 16

passant un paper amb lleixiu, eixugant i posteriorment tractar-lo amb etanol al 70% abans de posar-los a les centrífugues o qualsevol altre aparell, o bé, treure'ls de la sala.

11. Treballeu de forma acurada per a evitar vessaments i producció d'aerosols. No mantingueu les pipetes llargues enganxades al pipetejador a sobre de la superfície de treball per evitar degoteig. Tingueu una precaució especial a l'hora de *vortexar* i centrifugar tubs i eppendorfs, sobretot si contenen substàncies infeccioses. Vigileu que els tubs i epp estiguin perfectament ben tancats.
12. En cas de vessaments de medi contaminat:
  - Cobriu el medi amb paper absorbent i immediatament neutralitzar-ho amb lleixiu concentrat durant 10-15 minuts.
  - Llençar el paper al contenidor de residus contaminats.
  - Desinfecteu la superfície amb etanol al 70%.
13. En cas que es produeixi el vessament en un rotor de la centrífuga, espereu una mica abans d'obrir-la per evitar respirar els aerosols produïts i procediu com a la Bio-II-A. Finalment, deixeu el material trencat dins la campana amb els UV durant 20 min.
14. En cas d'accident del manipulador:
  - Primerament, treieu la roba que s'hagi pogut contaminar. Aquesta es descontaminarà dins de la campana amb els UV i posteriorment, es rentarà amb lleixiu.
  - Renteu bé la pell o la ferida amb aigua corrent sense fregar per a no irritar la pell.
  - Desinfectar amb etanol al 70%.
  - Si es tracta d'una ferida oberta aplicar povidona iodada (betadine) i apòsit.

## **7.2. INCUBADORS DE CO<sub>2</sub>:**

### **a. Definició:**


L'incubador de CO<sub>2</sub> és una cabina 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 CO<sub>2</sub> (5%) (necessari per a la respiració cel·lular).
- humitat elevada (per evitar l'evaporació de l'aigua del medi de cultiu).

Per a 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 dels prestatges.

### **b. Instruccions d'ús:**

1. Les plaques es dipositaran a l'incubador corresponent (primaris, línies, virus) a sobre de safates, per a facilitar el dipòsit de plaques als prestatges i per a evitar vessaments sobre l'incubador. Les safates són propietat de cada grup. 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.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 10 de 16

2. La manipulació de les plaques s'ha de fer amb cura per evitar vessaments agafant-les de forma que no s'obri la tapa i no perdi l'horitzontalitat.
3. Per evitar contaminacions és necessari mantenir els prestatges nets, i, si hi ha un vessament accidental posar-hi paper amb lleixiu, eixugar-ho i desinfectar amb etanol. Si es tracta de l'incubador de virus deixar actuar el lleixiu 15 min. Finalment anoteu-ho al full d'incidències.
4. Quan tinguem cultius contaminats els haurem d'eliminar immediatament i anotar-ho al **registre de contaminacions** del laboratori.
5. Els incubadors es calibren cada cert temps automàticament. Mentre l'incubador s'està calibrant no es pot obrir la porta ja que el desestabilitzaríem. Esperarem a que l'incubador torni al seu estat inicial.

### 7.3. MICROSCOPIS I LUPES

1. Netejar els oculars amb paper i etanol al 70% i la platina on dipositem la placa a observar , així evitarem problemes de contagi de contaminacions entre usuaris i de les cèl·lules.
2. Col·loqueu la mostra a la platina, posar els augments necessaris i enfocar per visualitzar les cèl·lules.
3. Si hi ha qualsevol funció que no es conegui no s'ha de manipular, cal demanar assessorament prèviament. Si es detecta algun mal funcionament, aviseu al personal del servei.
4. Recordeu de tancar el llum de microscopis i lupes en acabar de treballar.
5. Al laboratori 1.9 tapeu els microscopis i lupes si creieu que sou l'últim a treballar-hi. A la nit s'engeguen els UV a la sala i cal protegir-los.

#### 7.3.1 Microscopis de contrast de fase invertits:

##### a. Definició:

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


El fet de que les mostres a observar es trobin en recipients gruixuts fa que un microscopi convencional no sigui adequat, pel que s'han desenvolupat microscopis en els quals 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 perquè 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 fase, 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 una làmpada que emet llum a diferents longituds d'ona permetent visualitzar imatges que tenen fluorescència o que estan marcats amb fluorocroms.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 11 de 16

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

**b. Instruccions d'ús:**

- Als microscopis dels labs. -1.3 i 3.9, per tal d'allargar la vida de la bombeta de fluorescència, un cop engegada no es pot tancar fins al cap de 15 minuts; i un cop desconnectada no es pot tornar a engegar fins al cap de 10 minuts.
- Per a la gestió del manteniment de la làmpada fluorescència del microscopi hi ha uns **registres de temps d'utilització** (P-CC-07) que han de ser omplerts pels usuaris.
- Seguir les instruccions de l'aparell.

<b>7.3.3 Lupes de dissecció:</b>
----------------------------------

**a. Definició:**

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

**b. Instruccions d'ús:**

- Netejar els oculars amb paper i etanol al 70% i la platina on dipositem la placa a observar, així evitarem problemes de contagi de contaminacions entre usuaris i de les cèl·lules.
- Posar la mostra sobre la platina i enfocar per tal de fer la dissecció.
- Durant la dissecció s'ha de vigilar amb el material punxant, i si es produeix un tall netejar la ferida amb aigua i sabó i aplicar betadine i un apòsit.


## **7.4. CENTRÍFUGUES:**

**a. Definició:**

Al laboratori de cultius es necessita una centrífuga per a 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-la amb el mateix volum a la posició simètrica del sentit contrari.
- Escolliu el programa adequat i engegueu l'aparell.
- Si es produeix el trencament d'un tub dins de la centrífuga: abans d'obrir-la, espereu que es dipositin els aerosols que s'hagin pogut formar; desinfecteu amb un paper amb lleixiu i seguidament amb etanol. Si es tracta de virus, deixeu actuar el lleixiu 15 min.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 12 de 16

## 7.5 BANYS:

### a. Definició:

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

### b. Instruccions d'ús:

- Reompliu el bany amb aigua destil·lada fins que cobreixi la resistència (alguns banys es bloquegen si no hi ha prou aigua i abans de tornar-los a engegar se'ls ha de fer un reset).
- Engegueu el capçal (trigarà aproximadament 15 minuts en arribar a la temperatura de 37 °C).
- Quan no hi hagi ampolles ni tubs a dins del bany, apagueu el capçal.

### 7.5.1. TANC DE N<sub>2</sub> LÍQUID (-196°C):

#### a. Definició:

Tanc que conté N<sub>2</sub> líquid que té un alt poder frigorífic (-196°C) i s'utilitza per emmagatzemar les línies cel·lulars.

#### b. Instruccions d'ús:

- S'ha de manipular amb guants i és convenient protegir els ulls i portar sabates tapades per a protegir els peus, ja que si hi ha una esquitxada, el contacte del N<sub>2</sub> amb la pell produeix una cremada.
- Cada grup té assignades unes caixes i controla els seus vials.
- Abans d'obrir la tapa, heu de conèixer en quin rack es troba el vial que us interessa per evitar una evaporació excessiva de N<sub>2</sub> perquè a més desplaça l'oxigen.

## 7.6 CÀMERA 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, CO<sub>2</sub>, temperatura i humitat. Té la característica que les mostres es poden introduir, manipular, incubar, examinar i treure sense perdre les condicions ambientals per-establertes.

Abans d'usar-la per primer cop contacteu amb els tècnics del servei.

## 8. CONTAMINACIÓ DE CULTIUS

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

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

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 13 de 16

Sovint, els cultius es contaminen amb microorganismes provinents de les mans o de la boca, per això és important utilitzar guants i rentar-se les mans cada cop que es treballa, així com utilitzar una substància desinfectant com ara l'etanol.

Una altra font de contaminació és la roba. Posar-se una bata neta abans d'entrar a la sala o utilitzar sabates diferents a les del carrer redueix molt el nombre de gèrmens presents a la sala. Els jerséis de llana o similars a dins de les campanes són una font de contaminació.

➔ Per tant, s'ha de portar bata neta, treballar amb guants estèrils i evitar tot contacte del material que ha d'entrar en contacte amb el cultiu. Eviteu passar el braç, la mà... per sobre de qualsevol material obert, plaques, puntes, pipetes, tubs, medis, etc. continguin o no el cultiu i treballeu a la part central de la campana.

De la mateixa manera, un cop s'està treballant dins una campana no s'hauria de respondre al telèfon, tocar els mànecs de les portes, rascar-se els cabells, el nas, etc. sense abans canviar-se els guants, rentar-se les mans o desinfectar-los.

La superfície de la campana ha d'estar lliure d'aglomeracions de material . Per tant evitar entrar-hi caps de cartró, etc. i procurar que el flux laminar i la llum ultraviolada pugui passar entre tots els objectes presents a la campana.

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

➔ Per això heu d'evitar:

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



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

-Treballar amb material no estèril o contaminat.

-Quan es retiren medis i altres components del bany per usar-los a la campana és molt important eixugar les restes d'aigua i passar etanol a la superfície de l'ampolla/tub abans no l'entrem a la campana.

L'exterior de les plaques que contenen el cultiu inicialment és estèril, però en el moment que les movem cap a l'incubador, les hem de mantenir el màxim de netes possible:

➔ Tocar les plaques amb guants o amb les mans netes i etanolitzades. Dipositeu les plaques dins de safates a l'interior de l'incubador. Quan les mireu al microscopi, hem d'assegurar-nos que la platina ha estat desinfectada prèviament. Finalment, recordeu agafar la placa delicadament, (evitant moviments que puguin fer vessar el medi o que aquest toqui la tapa de la placa), però amb fermesa per evitar qualsevol obertura involuntària de la placa fora de la campana.

 	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>			
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>			
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018	Pàg 14 de 16

## 9. INSTRUCCIONS EN CAS DE CONTAMINACIÓ:

- Si es contamina un cultiu cel·lular, anoteu-ho al **registre de contaminacions (P-CC-10)**.
- Eliminareu el cultiu:
  - Poseu lleixiu 70% a la placa.
  - Deixeu actuar 10 min.
  - Aspireu el líquid.
  - Llenceu la placa al contenidor de residus negre.

## 10. CONTROL DE *Mycoplasma* A LÍNIES:


- El micoplasma és un bacteri que pertany a la família dels *Mollicutes* i inclou més de 180 diferents espècies, 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 mida d'entre els 0.2-0.8 µm. No té paret cel·lular i acostuma a estar adherit a la superfície de la membrana cel·lular d'altres organismes aprofitant-se dels seus hostes per absorbir nutrients. A la natura es troba com a paràsit d'humans, mamífers, rèptils, insectes i plantes.
- El micoplasma creix poc a poc, no mata les cèl·lules però els afecta diferents paràmetres cel·lulars com un augment a la sensibilitat dels inductors d'apoptosi, aberracions de cromosomes, disrupció en la síntesi del DNA, alteracions en l'eficiència de les transfeccions, inhibició del creixement cel·lular, etc.

Per tal de garantir que les sales de línies es troben lliures de *Mycoplasma*, es fan controls periòdics en els que es testen les línies amb les que treballen els usuaris. Per tal de dur-los a terme, els usuaris ens han de facilitar les mostres seguint el següent protocol:

- Recolliu el sobrenedant de cultius cel·lulars que hagi estat almenys 48h en contacte amb les cèl·lules (preferiblement 72h). No s'acceptaran mostres infectades amb virus. Marqueu clarament l'usuari del tub

Ompliu el **full de sol·licitud (P-CC-2)** entregat via e-mail o descarregat a través de la pàg. web de l'IRBLleida (<http://www.irbllleida.org/es/servicios-cientifico-tecnicos/cultivos-celulares/>) I feu-nos el arribar per coreu electrònic

- Nom línia
- Tipus cel·lular
- Origen (estocs, manteniment,...)
- Nom de la persona i grup
- Data de recollida
- L'anàlisi per PCR es realitzarà un cop a la setmana.

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 15 de 16


- El resultat es farà saber via e-mail. Si el resultat és positiu i en cas que l'usuari no opti per destruir les cèl·lules, els tècnics de SCC estan autoritzats per exigir el trasllat de la línia cel·lular a la sala adequada.

## 11. INSTRUCCIONS EN CAS D'AVARIES I INCIDÈNCIES:

- Si ocorre qualsevol incidència, anoteu-la al **registre d'incidències (P-CC-09)**, enviar un e-mail o trucar al **telèfon d'incidències 12953 o 664340756**.
- Si es tracta d'una incidència d'**urgent** resolució, comuniquen-la directament als tècnics de laboratori o a la responsable del SCT via ext. telefònica o via telèfon d'incidències 12953 o 664340756.
- Els tècnics de laboratori prendran les mesures oportunes i faran un seguiment de la resolució.
- Si et trobes sol en aquell moment, mira si hi ha alguna actuació que podries fer que evitaria danys majors, p.ex. si un incubador s'espatlla, mou totes les plaques de tots els usuaris a un incubador que funcioni correctament.

## 12. INSTRUCCIONS GENERALS EN CAS D'ACCIDENT:

- **NORMA GENERAL:** la majoria dels agents de risc manipulats (VHB, VIH, micoplasma) s'inactiven amb lleixiu (hipoclorit al 1%). A més en funció de l'agent també s'inactiven amb alcohol o sabó. Conseqüentment:
- **DAMUNT DE SUPERFÍCIES:** apliqueu lleixiu, deixeu actuar 10-15 min. i eixugueu amb paper de filtre que es llençarà al contenidor de bioseguretat (blau), després desinfecteu amb etanol al 70%.
- **DAMUNT DE PELL, ROBA o SUPERFÍCIES NO-RESISTENTS:**
  - Primer traieu-vos la roba.
  - Renteu amb aigua corrent sense fregar la pell.
  - Apliqueu sabó de mans i esbandiu llargament amb aigua corrent.
  - Desinfecteu amb etanol al 70%.
  - Si es tracta d'una ferida oberta, renteu amb aigua i sabó i a continuació apliqueu solució iodada i apòsit.
- **FINALMENT:**
  - **SICAL, TRUQUEU ALS SERVEIS D'EMERGÈNCIES (telf:112) i/o ANEU A LA MUTUA INDICADA SEGONS L'ADSCRIPCIÓ A IRB O UDL.**
  - **NOTIFIQUEU-HO ALS RESPONSABLES DEL SCT I OMPLIU UN FORMULARI DE NOTIFICACIÓ D'ACCIDENTS.**

	<b>DOCUMENTS SCT-CC</b>		
	<b>DIRECTRIUS DE FUNCIONAMENT DELS LABORATORIS DE CULTIUS CEL·LULARS</b>		
<b>DOC-CC-02</b>	Edició: 1	Mod: 1	Data ed. o modif.: 05-03-2018
			Pàg 16 de 16

## ANNEX I. Tasques de manteniment dels aparells i dels laboratoris

- Les **campanes de flux laminar/horitzontal** s'han de desinfectar a fons un cop a l'any. Aquestes passen una revisió del flux i del nivell de partícules anual. La seva superfície i parets s'ha de netejar i desinfectar amb alcohol cada cop que s'utilitza.
- La **campana d'hipòxia** passa una revisió un cop cada 2 anys. L'oxigen s'ha de calibrar un cop al mes.
- Els **laboratoris de cultius** han de tenir una neteja bàsica diària, així com una de més profunda un o dos cops a l'any per minimitzar-ne l'acumulació de pols i d'altres partícules.
- Els **tancs de Nitrogen líquid** s'han de revisar periòdicament assegurant una fase líquida i una de vapor dins els tancs on es guarden les cèl·lules. Aquests es reompliran en funció de les necessitats.
- Els nivells dels **gasos** de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, i aire sintètic s'han de revisar periòdicament per assegurar el subministrament als incubadors i a la càmera d'hipòxia.
- **L'incubador** ha de rebre CO<sub>2</sub> a una pressió de 0.8-1.5 bars. S'ha de desinfectar a fons (canvi de filtres, desmuntatge...) un o dos cops a l'any o en funció de la necessitat. Durant la resta de l'any s'ha de netejar la base, les portes i la safata de l'aigua periòdicament.
- **El bany** s'ha de netejar periòdicament amb aigua i sabó i omplir-lo fins a cobrir la resistència amb aigua destil·lada. El capçal del bany si sona l'alarma pot ser per sobreescalfament, s'ha d'afegir més aigua al bany i fer-li un *reset* al capçal (botó petit a la part de darrera, accés amb una punta de bolígraf).
- Les **làmpades dels microscopis**, lupes i làmpades de fluorescència s'han de canviar quan es fonen o quan han sobrepassat el seu número màxim d'hores de vida. En aquell moment s'han de revisar els microscopis i comprovar que les noves làmpades estan centrades.
- Qualsevol incident o averia s'ha de contactar amb el servei tècnic de l'aparell concret.