CAPITOLO 5. RISCHIO BIOLOGICO E PROCEDURE DI SICUREZZA

5.3 Procedure per i laboratori con uso di colture cellulari

Sebbene normalmente non rischiose per l'operatore, le colture cellulari sono a tutti gli effetti agenti biologici ai sensi del D.Lgs 81/08.

Sono di seguito indicate regole e norme per coloro che operano in laboratori dove vengono manipolate colture cellulari, primarie o stabilizzate, **non infette**. Infatti, qualora le colture cellulari siano volontariamente infettate con agenti microbici, come nel caso in cui siano usate per diagnosi virologiche o come substrato per la crescita di microrganismi, le norme di riferimento restano quelle indicate al Paragrafo 5.2.

Il rischio da manipolazione di colture cellulari non infette è legato alle proprietà intrinseche delle cellule e alla possibilità che la coltura cellulare possa essere contaminata involontariamente da patogeni. Infatti, le colture manipolate nei laboratori descritti nel paragrafo in oggetto, provengono:

- da tessuti espiantati in sede chirurgica con procedure sterili;
- da cadavere non affetto da processi infettivi locali o sistemici;
- da carcasse di animali sottoposti a regolare macellazione.

Scopo principale delle procedure di buona pratica nella manipolazione di colture cellulari è dunque quello di prevenire la contaminazione accidentale da microrganismi e di preservare il mantenimento della stabilità delle linee cellulari.

5.3.1. Accesso ai laboratori

L'ingresso al laboratorio è ristretto al personale autorizzato, al quale sia stata assicurata l'informazione/formazione specifica riguardo ai potenziali rischi connessi con l'attività lavorativa, alle norme di comportamento, all'ubicazione degli apparati di emergenza (cassetta di pronto soccorso, lava-occhi, etc…). Le porte del laboratorio con utilizzo di colture cellulari devono essere tenute chiuse e su ogni porta è presente un cartello con il pittogramma di "Ingresso vietato ai non addetti ai lavori" (Figura 18) e "Zona a potenziale rischio biologico" (Figura 1). Le lavoratrici in stato di gravidanza o in allattamento devono seguire le procedure riportate sul sito del Servizio di Prevenzione e Protezione dell'Ateneo disponibili all'indirizzo: https://www.unipg.it/ateneo/organizzazione/servizio-di-prevenzione-e-protezione.

Deve, inoltre, essere limitato l'accesso contemporaneo di più persone in laboratorio.

5.3.2 Norme generali di comportamento

Nelle aree di lavoro del laboratorio non è permesso mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o conservare cibo. Inoltre, è vietato usare recipienti del laboratorio per conservare alimenti o adoperare attrezzature del laboratorio per preparare o scaldare alimenti e bevande. Nessun oggetto dovrebbe essere portato alla bocca in laboratorio (penne, matite, chewing-gum, etc…), ed è rigorosamente vietato pipettare a bocca.

5.3.3 Norme di buona prassi specifiche per i laboratori con colture cellulari

Nei laboratori specifici del DMV dove si utilizzano a motivo di ricerca colture cellulari è necessario rispettare le seguenti norme di buona prassi:

- Togliere o coprire accessori personali per evitare contaminazioni (es, bracciali, anelli, orologio); i capelli vanno tenuti raccolti.
- Procedere all'igiene delle mani prima di indossare i guanti e dopo averli tolti (in ingresso e in uscita dal laboratorio).

- Identificare in maniera chiara tutti i contenitori che si usano e mantenere separati i flaconi di mezzi di coltura per ciascuna linea cellulare.
- Lavorare tutti i campioni di cellule e tessuti sotto cappa di sicurezza biologica di Classe II (Figura 33).
- Verificare con frequenza pressoché giornaliera l'assenza nei terreni di contaminazioni batteriche o fungine evidenti o di altre alterazioni; effettuare periodicamente a cadenza programmata test di assenza da micoplasmi (sono disponibili kit commerciali, incluso RT-PCR, per il monitoraggio rapido delle contaminazioni da micoplasma).
- Preferire l'utilizzo di materiale in plastica monouso.
- Rispettare il numero di passaggi colturali previsti dalle schede tecniche di accompagnamento delle linee cellulari acquistate da banche autenticate.
- Eliminare immediatamente colture contaminate.
- Conservare in luogo noto e rendere disponibile agli operatori la documentazione fornita a corredo delle cellule acquistate da fonti certificate (*product sheet* e *material safety data sheet*).
- Non lasciare le cellule fuori dall'incubatore per periodi prolungati.

5.3.4 Indumenti protettivi e DPI specifici per i laboratori con colture cellulari
Nei laboratori dove si ha contatto con colture cellulari è necessario:

- Indossare sempre, prima di entrare, in laboratorio un camice dedicato al laboratorio di colture cellulari; in alternativa adoperare camici monouso.
- Adoperare guanti monouso a norma EN 374 idonei alla durata della sessione di lavoro, con grado di protezione idoneo al tempo di lavoro; disinfettare, prima dell'uso e se necessario periodicamente i guanti adoperati con isopropanolo o con etanolo al 70% per 30 secondi.

5.3.5 Gestione dell'area di lavoro e degli strumenti
È necessario rispettare delle norme di comportamento per le aree lavoro e gli strumenti presenti nei laboratori con le colture cellulari, che si possono sintetizzare in:

- Mantenere le superfici di lavoro e, soprattutto, quella della cappa il più possibile sgombre da oggetti e in ordine; ridurre al minimo la presenza di scatole e imballaggi di cartone nel laboratorio.
- Programmare la regolare pulizia della cappa biologica e incubatore e rispettare le scadenze.
- Rispettare le scadenze di sostituzione del filtro Hepa della cappa biologica.
- Pulire tutte le superfici con disinfettante prima di ogni operazione, tra operazioni diverse, e tra un operatore e l'altro (ad esempio con isopropanolo al 70% tra operazioni diverse) lasciando un lasso di tempo minimo di 15 minuti prima di maneggiare linee cellulari diverse.
- Provvedere alla regolare pulizia e ricambio dei bagni ad acqua onde prevenire contaminazioni microbiche; valutare se adoperare agenti batteriostatici nei bagni termostatati.

5.3.6 Gestione del materiale contaminato e dei rifiuti

Non eliminare i rifiuti nel contenitore dei rifiuti indifferenziati; i rifiuti provenienti dalle attività di laboratorio di colture cellulari venuti a contatto con materiale biologico (non necessariamente infetto) sono da considerarsi rifiuti sanitari a rischio infettivo e come tali vanno eliminati negli appositi contenitori con il pittogramma di rischio biologico (Figura 1) e rifiuto speciale (Figura 11).

5.3.7 Gestione degli sversamenti

Nel caso di spargimento accidentale di colture (ad es. rovesciamento fiasche contenenti colture cellulari), coprire il materiale con un panno di stoffa o di carta su cui va versato del disinfettante lasciato agire almeno per 30 minuti. In ogni caso fare riferimento alle Procedure e gestione dell'emergenza riportate nel Capitolo 8.

CAPITOLO 8. PROCEDURE DI GESTIONE DELL'EMERGENZA

I Piani di Evacuazione ed Emergenza (PdE) del DMV sono disponibili per intero sul sito web del DMV all'indirizzo: https://medvet.unipg.it/home/sicurezza/piano-di-emergenza-interno-pei.

8.2 Procedura e gestione dell'emergenza in caso di rischio biologico

In **caso di infezione o sospetta infezione con agente trasmissibile** di interesse veterinario o a rischio zoonotico dei gruppi 2 e 3:

- utilizzare tutti i presidi atti a impedire la diffusione dell'infezione ad altri pazienti, agli operatori e all'ambiente (camici monouso, guanti monouso, mascherine monouso, agenti disinfettanti etc.).

In **caso di contatto (mani, occhi, bocca) con materiale potenzialmente infetto**:

- lavare con acqua abbondante (in caso di contatto oculare, mantenendo le palpebre aperte)
- togliere gli indumenti contaminati
- avvisare gli addetti al primo soccorso se è necessaria l'attivazione del piano di emergenza ed eventualmente chiamare il 112, come riportato nel DVR Biologico del DMV disponibile sul sito del DMV all'indirizzo https://medvet.unipg.it/home/sicurezza.

In **caso di contaminazioni oculari con materiali di natura chimica o biologica**:

- interrompere l'esecuzione delle operazioni
- provvedere al lavaggio immediato delle parti colpite, mediante lavaocchi a spruzzo
- se necessario, lavaggio corporeo supplementare, mediante l'uso delle docce presenti negli spogliatoi.

In **caso di spargimento di materiale biologico** su superfici:

- indossare mascherina, occhiali e guanti di gomma
- coprire con carta assorbente un'area più vasta di quella visibilmente contaminata
- versare disinfettante ad ampio spettro di azione
- lasciare agire almeno per 15 minuti
- asportare con pinze e guanti il materiale così trattato e smaltire come rifiuto speciale
- lavare con detergente con tensioattivi o sali d'ammonio
- risciacquare
- ripetere la procedura di disinfezione.

In **caso di sversamento di materiale** all'interno delle cappe di sicurezza biologica:

- Impostare la ventilazione della cabina alla massima velocità
- Indossare guanti e facciale filtrante, quindi disinfettare accuratamente le superfici
- Raccogliere tutto il materiale contaminato e trasferirlo, insieme ai guanti e alla maschera, in un sacchetto per i rifiuti sanitari a rischio infettivo
- Sterilizzare in autoclave tutto il materiale non monouso utilizzato per la pulizia.

Procedura di decontaminazione in caso di sversamento di liquido biologico:

- Indossare due paia di guanti e l'intero equipaggiamento DPI.
- Coprire la sostanza sversata con un panno o carta assorbente imbevuta di disinfettante e lasciare agire per almeno 30 minuti.
- Prelevare il materiale assorbente e gli oggetti contaminati con una paletta e smaltirli negli appositi contenitori per rifiuti biologici.
- Raccogliere eventuali frammenti di vetro con pinze e riporli nei contenitori specifici.
- Pulire e disinfettare accuratamente la superficie contaminata.
- Tutti i materiali contaminati, inclusi i DPI utilizzati, devono essere trattati come rifiuti biologici.
- In caso di contaminazione di documenti, trascrivere le informazioni su un nuovo foglio e smaltire l'originale nei contenitori per rifiuti biologici.
- Autoclavare o immergere per 24 ore nel disinfettante tutto il materiale non monouso che si è contaminato.

Nel **caso di dispersione ambientale o nel locale (laboratorio) di un agente biologico di gruppo 2 e 3**:

- Abbandonare immediatamente la zona interessata;
- Chiudere la stanza ed applicare sulla porta avvisi di zona contaminata e di divieto di ingresso;
- Segnalare al Responsabile l'evento e concordare insieme la metodologia per rimuovere il pericolo.

In **caso di segni o sintomi attribuibili a reazioni allergiche**, come irritazioni cutanee, congiuntivite o difficoltà respiratorie, riconducibili alla propria attività lavorativa (ad esempio, contatto con animali o piante responsabili dell'evento), è necessario che il lavoratore lo segnali prontamente al proprio Responsabile e richieda una visita medica al Medico Competente.

Inoltre, eventuali patologie allergiche devono essere comunicate al Medico Competente, il quale, a sua volta, darà indicazioni al Direttore del DMV o al Responsabile della struttura di appartenenza, delle misure di tutela a garanzia della salute del lavoratore.

8.3 Procedura e gestione dell'emergenza in caso di rischio chimico

L'impiego, lo stoccaggio e lo smaltimento di agenti chimici possono generare situazioni di pericolo immediato, capaci di provocare emergenze ambientali di varia entità e rischi per l'incolumità delle persone. È essenziale che tali situazioni siano affrontate con competenza dal personale responsabile, al fine di prevenire o almeno mitigare eventuali conseguenze dannose per i lavoratori e l'ambiente.

MANUALE DI BIOSICUREZZA E ANALISI E PREVENZIONE DEI RISCHI

Versione 01/2025 - Aprile 2025

Università degli Studi di Perugia

Dipartimento di Medicina Veterinaria

Redazione a cura della Commissione Sicurezza sui luoghi di Lavoro e Biosicurezza

Membri della Commissione Coinvolti nella Stesura

F. Beccati (Delegato Dipartimentale)

S. Businelli (Addetto del Servizio di Prevenzione e Protezione dell'Ateneo di Perugia), M.B. Conti, M. Diaferia, D. Miraglia, M. Sforna, V. Stefanetti, L. Terracina, M. Gatti (studentessa), A. Quartesan (studentessa)

Revisionato da:

Servizio di Prevenzione e Protezione dell'Ateneo di Perugia, Esperto di Radioprotezione e Esperto responsabile della sicurezza in Risonanza Magnetica (Dr. A. Chiappiniello) dell'Ateneo di Perugia, Personale strutturato docente e tecnico-amministrativo del Dipartimento di Medicina Veterinaria, Contrattisti dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Perugia

Approvato da:

Consiglio di Dipartimento di Medicina Veterinaria Allargato