

PROCEDURE DI SICUREZZA PER I LABORATORI DI COLTURE CELLULARI

Autore	SPP – rischio biologico		Motivo revisione
Data redazione	2016	2018	Aggiornamento delle buone pratiche di coltura cellulare anche rispetto ai nuovi sistemi colturali; uniformità con procedure AB
Rev.	0	1	

1- Accesso al laboratorio

- Divieti e restrizioni
- Segnaletica e informazione

2 - Norme di comportamento per la manipolazione cellulare

- Divieti e norme generali di comportamento
- norme di buona prassi (cosa fare - cosa NON fare)
- Indumenti protettivi e D.P.I

3 - Area di lavoro e attrezzature

- Pulizia e decontaminazione superfici e strumenti
- Gestione del materiale contaminato e dei rifiuti
- Gestione sversamenti

NOTA – RICHIAMI NORMATIVI-

Le colture cellulari sono a tutti gli effetti “agenti biologici” ai sensi del D.Lgs 81/08. In caso di utilizzo di agenti biologici di gruppo 2 o superiore occorre effettuare comunicazione al Servizio Prevenzione e Protezione in modo da provvedere ai necessari adempimenti normativi ai sensi del D.Lgs 81/08 (comunicazione all’organo di vigilanza).

In caso di impiego di MOGM (microrganismi geneticamente modificati) ai sensi del D.Lgs 206/2001, occorre preventivamente all’inizio attività verificare il possesso delle dovute autorizzazioni ministeriali o in caso contrario procedere alle pratiche autorizzative preliminari, facendone in ogni caso comunicazione al Servizio Prevenzione e Protezione. Si ricorda che ricadono nel campo di applicazione di tale normativa tutte le attività che implicano l’uso di microrganismi geneticamente modificati, inclusa la semplice conservazione di ceppi o linee cellulari geneticamente modificati, anche se acquistati come tali da ditte certificate.

PREMESSA

Sono presentate di seguito regole e norme di base per gli operatori che lavorano in laboratori dove si effettua manipolazione di colture cellulari, stabilizzate o primarie.

Sebbene normalmente non dannosi per l'operatore, cellule e tessuti vanno considerati come potenzialmente infetti: il rischio da manipolazione è legato alle proprietà intrinseche delle cellule e/o alle caratteristiche acquisite in seguito alla manipolazione genica, ed alla possibilità che la coltura cellulare possa essere contaminata da patogeni.

Scopo principale delle procedure di buona pratica nella manipolazione di colture cellulari è dunque quello di prevenire l'errata identificazione della linea cellulare e la contaminazione accidentale da microrganismi e di preservare il mantenimento della stabilità genetica e fenotipica delle linee cellulari

-Le procedure mostrate sono in linea con le GCCP internazionali e nazionali (rif.CDC, ECACC, Inail, ISPRA)-

1. Accesso al laboratorio

- L'ingresso al laboratorio è ristretto al personale autorizzato, al quale sia stata assicurata dal RAR 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, lavaocchi, etc...)
- Le porte del laboratorio con utilizzo di colture cellulari devono essere tenute chiuse
- Se le colture cellulari utilizzate sono di classe 2 o superiore, all'ingresso del laboratorio, deve essere affisso il segnale di avvertimento di Rischio Biologico, oltre che di divieto di ingresso al personale non autorizzato
- Le donne in età fertile vanno informate del rischio per un futuro bambino legato all'esposizione ad agenti biologici
- Le lavoratrici in stato di gravidanza o in allattamento devono comunicare tempestivamente al Responsabile il proprio stato, affinché siano approntate tutte le misure preventive e protettive per la tutela delle lavoratrici madri in relazione alla valutazione dei rischi, inclusa l'astensione obbligatoria dall'attività lavorativa
- Deve essere evitato l'accesso contemporaneo di più persone in laboratorio

2. Norme di comportamento per la manipolazione cellulare

a. Divieti e 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...)
- È rigorosamente vietato pipettare a bocca
- Togliere o coprire accessori personali per evitare contaminazioni (es, bracciali, anelli, orologio); i capelli vanno tenuti raccolti

b. Norme di buona prassi – “cosa fare”

- Tutte le linee cellulari di nuovo acquisto (se non da banche autenticate) o donazione devono essere sottoposte a test di conferma di identità (specie e tessuto di provenienza), ed esenzione da contaminazioni microbiche (comprese quelle da micoplasmi); fino a quando tali controlli di qualità non sono terminati, la linea cellulare deve essere tenuta in quarantena

- Procedere all'igiene delle mani prima di indossare i guanti e dopo averli tolti (in ingresso e in uscita dal lab.)
 - 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
 - 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)
 - Maneggiare una sola linea cellulare alla volta per evitare fenomeni di contaminazione crociata
 - Preferire l'utilizzo di materiale in plastica monouso ed evitare, se non necessario, l'uso di aghi e dispositivi taglienti
 - 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*)
 - Nel caso di utilizzo di cellule iPS, è essenziale mantenere le colture separate per prevenire la possibilità di contaminazioni crociate
 - La manipolazione di "organoidi" richiede anch'essa la messa a punto di schemi e procedure operative altamente specializzate da parte di personale qualificato: in particolare va considerato che organoidi derivanti dall'apparato gastrointestinale e dalle vie respiratorie possono portare con sé naturalmente infezioni latenti da micoplasma
- c. **Norme di buona prassi – "cosa NON fare"**
- Non manipolare cellule da fonti non sicure o di dubbia e non ricostruibile provenienza, prima di averle tenute in quarantena ed aver completato i test di qualità (relativi a identificazione ed assenza di contaminazioni)
 - Non manipolare cellule di dubbia origine contemporaneamente alle altre linee cellulari
 - Non tenere le cellule in coltura per lungo tempo
 - Non tenere le cellule per troppo tempo a confluenza
 - Non usare terreni completi oltre le 6-8 settimane
 - E' preferibile non usare regolarmente l'aggiunta di antibiotici al mezzo di coltura poiché possono causare fenomeni di antibiotico-resistenza e nascondere contaminazioni sottostanti
 - Non adoperare, per allestire colture primarie, tessuti e cellule derivanti da donatori del proprio staff
 - Non lasciare le cellule fuori dall'incubatore per periodi prolungati
- d. **Indumenti protettivi e D.P.I**
- Indossare sempre in laboratorio un camice dedicato al laboratorio di colture cellulari, da indossare prima di entrare; in alternativa adoperare camici monouso
 - Adoperare guanti monouso a norma EN 374 idonei alla protezione da rischio biologico, almeno con grado di protezione 2; se i guanti adoperati non sono sterili, disinfettarli prima dell'uso con isopropanolo o con etanolo al 70% per 30 secondi
 - Indossare sempre occhiali protettivi muniti di protezione laterale (a norma EN 166) durante le operazioni condotte in laboratorio
 - Tenere a disposizione facciali filtranti monouso, almeno con grado di protezione 2 per le operazioni condotte fuori dalla cappa che potrebbero generare aerosol (FFP2 a norma EN 149)

3. Area di lavoro e attrezzature

a) Pulizia e decontaminazione superfici e strumenti

- 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 ed imballaggi di cartone nel lab.
- Programmare la regolare pulizia di cappa biologica e incubatore e rispettare le scadenze
- Rispettare le scadenze di sostituzione del filtro Hepa della cappa
- Pulire tutte le superfici con disinfettante prima di ogni sospensione, tra operazioni diverse, e tra un operatore e l'altro (ad esempio con isopropanolo al 70% tra operazioni diverse e 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 termostati

b) Gestione del materiale contaminato e dei rifiuti

- Non eliminare i rifiuti, anche se dopo sterilizzazione, nel contenitore come 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
- I materiali e le colture, prima di essere scartati, dovranno essere disinfettati o sterilizzati in autoclave o decontaminati
- I rifiuti liquidi (inclusi i terreni di colture delle cellule) vanno sterilizzati in autoclave prima della loro eliminazione, o in alternativa sottoposti all'azione di soluzioni disinfettanti (ipoclorito di sodio allo 0,5%) e collocati in idonei contenitori a tenuta. È vietato lo smaltimento in lavandino e/o negli scarichi

c) Gestione 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. Il materiale, recuperato con pinze o paletta, va autoclavato o immerso per 24 h nel disinfettante.

NOTA- per la **gestione emergenze** fare riferimento alla apposita sezione 3.d delle procedure di sicurezza per il laboratorio con uso di Agenti Biologici (da esporre nel locale)