

PROCEDURE DI SICUREZZA PER IL LABORATORIO DI COLTURE CELLULARI

Data redazione: marzo 2024

<p>RIFERIMENTI TELEFONICI</p> <p>Direzione DiSTABiF int: 4438</p> <p>Medico Competente Antonio Arnese 081 5667708</p> <p>Ufficio per la Sicurezza RSPP – diego.lama@unicampania.it</p> <p>Gestione Rifiuti Marco Mammucari int:4653</p>	<p>Per il D.Lgs 81/2008 le colture cellulari sono agenti biologici.</p> <p>Per utilizzare MOGM (microrganismi geneticamente modificati) si fa riferimento al D.Lgs 206/2001 che prevede il possesso di autorizzazioni ministeriali. L'uso va comunicato alla Direzione del Dipartimento e al Servizio Prevenzione e Protezione.</p>
---	--

Le procedure di buona pratica presentate rispecchiano le Good Cell Culture Practice di organizzazioni quali INAIL e CDC Guidelines for Biosafety Laboratory Competency e sono destinate agli operatori autorizzati che accedono al laboratorio di colture cellulari, stabilizzate o primarie. Le cellule vanno considerate come potenzialmente infette e il rischio da manipolazione è dovuto alla possibilità che la coltura cellulare possa essere contaminata da patogeni e alle proprietà intrinseche delle cellule e/o alle caratteristiche acquisite in seguito alla manipolazione genica. L'obiettivo principale delle norme è quello di prevenire potenziali rischi connessi con l'attività lavorativa, prevenire l'errata identificazione della linea cellulare e la contaminazione accidentale da microrganismi nonché di preservare il mantenimento della stabilità genetica e fenotipica delle linee cellulari.

1. Accesso al laboratorio

- L'ingresso al laboratorio è consentito a docenti/studenti autorizzati, informati e formati dal Responsabile del Laboratorio riguardo ai potenziali rischi connessi con l'attività lavorativa, all'uso di gas compressi, alle norme di comportamento, alla posizione degli apparati di emergenza (cassetta di pronto soccorso, lavaocchi, etc...)
- Le porte del laboratorio con utilizzo di colture cellulari devono essere tenute chiuse
- All'ingresso del laboratorio è bene che sia 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 di due persone per ogni gruppo di lavoro in laboratorio

2. Divieti e norme di comportamento in laboratorio

- Non è permesso mangiare, bere, fumare, portare cibo.
- Nessun oggetto dovrebbe essere portato alla bocca in laboratorio (penne, matite, chewing-gum, etc...)
- Togliere o coprire accessori personali per evitare contaminazioni (es, bracciali, anelli, orologio)
- I capelli vanno tenuti raccolti
- È sconsigliato l'uso di lenti a contatto
- Procedere all'igiene delle mani prima di indossare i guanti e dopo averli tolti
- Prima di maneggiare materiali pericolosi (normalmente contrassegnati da simboli) informarsi sulle precauzioni necessarie
- Adottare esclusivamente sistemi di tipo meccanico per pipettare i liquidi
- Sui contenitori conservati nei frigoriferi e nei freezer di uso comune, indicare il proprietario, la data e il nome scientifico dei materiali contenuti
- In caso di schizzi accidentali utilizzare i lavaocchi per eliminare prontamente ogni liquido potenzialmente pericoloso
- Inserire ogni spina nella sua presa, non utilizzare adattatori multipli N
- In caso di malfunzionamento di qualsiasi attrezzatura avvisare il RADoR
- Non lavorare da soli in laboratorio senza che ci siano altri nelle vicinanze
- Lasciare il camice dedicato sull'attaccapanni del laboratorio e smaltire guanti e copriscarpe
- Lavarsi le mani prima di uscire dal laboratorio
- Le ultime persone a lasciare il laboratorio sono responsabili del controllo finale.

3. Norme per la manipolazione delle linee cellulari

- Consultare sul sito del Dipartimento al link distabif.unicampania.it/ricerca/sicurezza-in-laboratorio la documentazione fornita a corredo delle cellule acquistate da fonti certificate (data sheet)
- 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.
- Lavorare tutti i campioni di cellule primarie 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;
- Maneggiare una sola linea cellulare alla volta, mantenere separati i flaconi di mezzi di coltura per ciascuna linea, 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
- 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 tenere le cellule in coltura, né a confluenza per lungo tempo
- Non usare terreni completi oltre le 6-8 settimane
- È preferibile non usare regolarmente l'aggiunta di antibiotici al mezzo di coltura poiché possono causare fenomeni di antibiotico-resistenza e nascondere contaminazioni sottostanti.

4. Utilizzo di sostanze considerate cancerogene o mutagene le sostanze che presentano le seguenti Frasi H: H350 - H350i - H351 - H340 - H341

- Utilizzare dispositivi per la protezione oculare e/o del volto testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche
- Utilizzare dispositivi per la protezione della pelle. Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.
- Utilizzare dispositivi per la protezione fisica. Indossare sempre il camice idoneo alla tipologia del laboratorio in modo correttamente abbottonato
- Utilizzare dispositivi per la protezione respiratoria quando siano generati vapori/aerosol.

5. Dispositivi di protezione collettiva (DPC) e individuali (DPI)

- Le attività di manipolazione devono essere effettuate sotto cappe di sicurezza Biohazard di tipo 1 e 2
- Spegnerne la lampada UV ed accendere il flusso dell'aria per almeno 5 minuti prima di iniziare a lavorare sotto cappa
- Indossare sempre in laboratorio un camice dedicato da indossare prima di entrare; in alternativa adoperare camici monouso
- Adoperare guanti monouso a norma EN 374 idonei alla protezione da rischio biologico, se i guanti adoperati non sono sterili, disinfettarli prima dell'uso con isopropanolo o con etanolo al 70% per 30 secondi
- Indossare copriscarpe monouso
- Tenere a disposizione mascherine filtranti monouso, almeno con grado di protezione 2 (FFP2) per le operazioni condotte fuori dalla cappa che potrebbero generare aerosol

6. Pulizia area di lavoro e attrezzature

- Mantenere le superfici di lavoro e soprattutto quella della cappa il più possibile sgombre da oggetti; 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%) e lasciando un lasso di tempo minimo di 15 minuti prima di maneggiare linee cellulari diverse.
- Centrifughe e rotori devono essere lasciati perfettamente puliti e disinfettati dopo l'uso

7. Dispositivi di protezione collettiva (DPC) e individuali (DPI)

- Le attività di manipolazione devono essere effettuate sotto cappe di sicurezza Biohazard di tipo 1 e 2
- Spegnere la lampada UV ed accendere il flusso dell'aria per almeno 5 minuti prima di iniziare a lavorare sotto cappa
- Indossare sempre in laboratorio un camice dedicato da indossare prima di entrare; in alternativa adoperare camici monouso
- Adoperare guanti monouso a norma EN 374 idonei alla protezione da rischio biologico, se i guanti adoperati non sono sterili, disinfettarli prima dell'uso con isopropanolo o con etanolo al 70% per 30 secondi
- Indossare copriscarpe monouso
- Tenere a disposizione mascherine filtranti monouso, almeno con grado di protezione 2 (FFP2) per le operazioni condotte fuori dalla cappa che potrebbero generare aerosol

8. Pulizia area di lavoro e attrezzature

- Mantenere le superfici di lavoro e soprattutto quella della cappa il più possibile sgombre da oggetti; 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%) e lasciando un lasso di tempo minimo di 15 minuti prima di maneggiare linee cellulari diverse.
- Centrifughe e rotori devono essere lasciati perfettamente puliti e disinfettati dopo l'uso

Gestione del materiale contaminato e dei rifiuti e degli sversamenti accidentali

- 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
- I rifiuti solidi (puntali, piastre di coltura ed altra plasticaria) vanno posti in contenitori posizionati sotto cappa, smaltiti dopo essere stati chiusi
- 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.

IN CASO DI INFORTUNIO COMUNICARLO IMMEDIATAMENTE AL RADoR. LA SEGNALAZIONE VA FATTA ANCHE NEL CASO DI LESIONI DI LIEVE ENTITA'