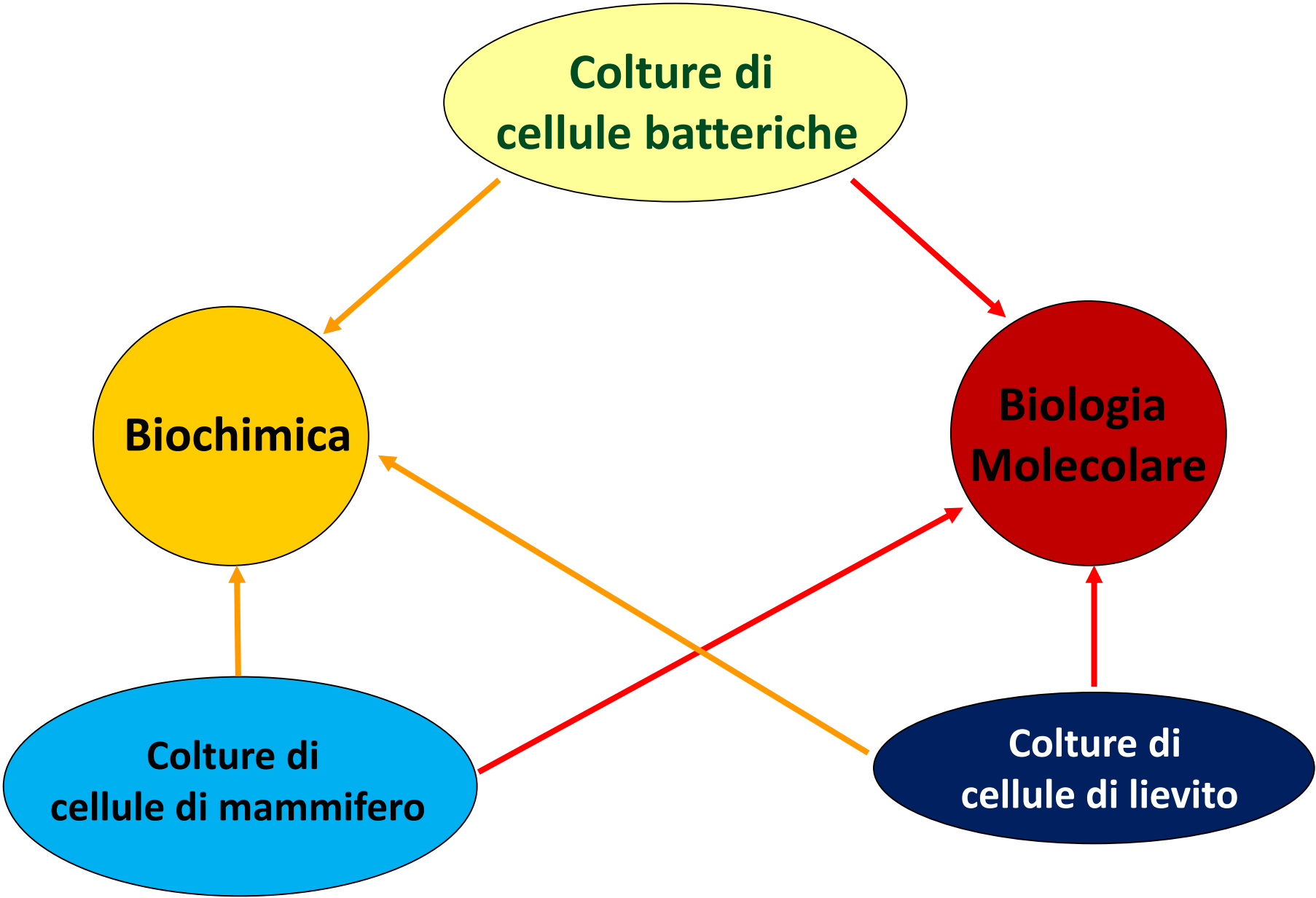




**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**

Impiego di MOGM nei laboratori di Ricerca (Biochimica, Biologia Molecolare e Fisiologia)

prof. Pasquale Scarcia



Sviluppo biotecnologico e settori industriali

- **Industria farmaceutica**
 - prodotti farmaceutici per la cura di malattie umane: antibiotici, vaccini, terapia genica
- **Diagnostica**
 - test clinici e diagnostici, test per alimenti, ambiente, agricoltura
- **Agricoltura/zootecnia/silvicoltura/orticoltura**
 - nuove varietà di piante coltivate e di animali, nuovi fertilizzanti e pesticidi
- **Industria alimentare**
 - nuovi prodotti alimentari
- **Ambiente**
 - *smaltimento dei rifiuti, biorisanamento, produzione di energia*
- **Industria chimica**
 - reagenti, enzimi, DNA/RNA, prodotti chimici particolari
- **Strumentazione**
 - impianti, bioreattori, software e attrezzature biotecnologiche ausiliari



Definizioni generali

e

Normativa di riferimento

Sicurezza

indica una condizione oggettiva che non presenta pericoli o una situazione in cui sia garantito alle singole persone il tranquillo svolgimento delle proprie attività

la garanzia e la **difesa contro eventuali pericoli** che possono accadere nel corso delle diverse attività lavorative svolte ed **strettamente collegata con le modalità operative** messe in atto e con i mezzi di protezione disponibili.

salvaguardare l'integrità psico-fisica di chi lavora: la salute è infatti un diritto di tutti e la sua tutela presuppone che tutti si impegnino nei loro comportamenti **rispettando le norme ed i doveri** che la rendono attuabile.



Percezione del Rischio

Modesta	Gli agenti hanno un effetto a lungo termine (es. cancerogeni-mutageni)
Fatalistica	Potenziati eventi infortunistici (es. rottura o sversamenti)
Immediata	Impatto con l'operatore è diretto (es. sostanze irritanti)
Drammatica	Al momento dell'emergenza (es. incendio)



**Uso o impiego di
agenti biologici**

**Rischio Biologico: esposizione ad agenti
biologici nell'ambito dell'attività lavorativa**

**Attività a rischio
potenziale di esposizione**



Rischio infettivo



Rischio biologico



Rischi di natura biologica



Rischio infettivo:

Le malattie infettive sono causate da agenti microbici (virus, batteri, funghi e protozoi)

Periodo di Incubazione: il tempo che intercorre dal contattato con il corpo umano e l'apparire dei primi sintomi

Infezione: presenza di agenti microbici che si riproducono all'interno dell'organismo.

Carica Infettante: il numero minimo di microorganismi necessario per dare inizio all'infezione.

Alcune malattie sono trasmissibili o contagiose



Allergie da agenti biologici

Reazione abnorme del sistema immunitario (produzione di IgE) contro sostanze estranee all'organismo (allergeni).

Gli allergeni possono essere inalati, ingeriti o toccati.

ALLERGENI:

Pollini (Graminacee, Cupressacee, Oleacee, ecc)

Muffe (organismi pluricellulari che producono spore:
Aspergillus, penicillium, fusarium, ecc)

Insetti (imenotteri, blatte e scarafaggi, acari, ecc.)

pelì di animali (sia domestici che di laboratorio)



SETTORE	ATTIVITA LAVORATIVA	AGENTE BIOLOGICO RICONTRABILE
AGRICOLTURA ZOOTECNIA, PESCOLTURA E ATTIVITA FORESTALI	ZOOTECNIA	<i>Bacillus anthracis; Borrelia burgdorferi; Brucella spp; Campylobacter spp; Clostridium tetani; Coxiella burnetii; Francisella tularensis; Helicobacter spp; Leptospira interrogans; Listeria monocytogenes; Yersinia spp; Mycobacterium spp; Salmonella spp; Streptococcus suis; Rickettsia canori; Orthomyxovirus; Poxvirus; Rhabdovirus; Papovavirus; Trichophyton spp; Echinococcus spp.</i>
	PESCOLTURA	<i>Clostridium tetani; Erysipelothrix rhusiopathiae; Vibrio spp; Nocardia spp; Pseudomonas spp; Leptospira interrogans, Salmonella spp; HAV; Giardia spp; Anisakis spp.</i>
	COLTIVAZIONI AGRARIE	<i>Borrelia burgdorferi, Brucella spp; Clostridium tetani; Escherichia coli; Salmonella spp, Shigella spp; Arbovirus; Enterovirus; Phlebovirus ; Alternaria alternata; Aspergillus spp; Ancylostoma duodenalis; Acari.</i>
	ATTIVITÀ FORESTALI	<i>Borrelia burgdorferi, Coxiella burnetii; Clostridium tetani; Francisella tularensis; Rickettsia spp, Sporotrichum schenckii.</i>
VETERINARIA	SERVIZI VETERINARI, RICERCA, SPERIMENTAZIONE FARMACI E METODI DIAGNOSTICI	<i>Brucella spp; Clostridium tetani; Escherichia coli, Francisella tularensis; Helicobacter spp; Leptospira interrogans; Mycobacterium spp; Salmonella spp, Rickettsia spp; Orthomyxovirus; Rhabdovirus; Trichophyton mentagrophytes.</i>
INDUSTRIA ALIMENTARE E DI TRASFORMAZIONE DEI DERIVATI ANIMALI	CASEIFICI	<i>Bacillus anthracis, Brucella spp; Campylobacter spp; Clostridium spp; Coxiella burnetii, Leptospira interrogans; Listeria monocytogenes; Yersinia spp; Mycobacterium spp, Pasteurella multocida; Salmonella spp; Staphylococcus aureus, Streptococcus spp; Aspergillus spp; Acari.</i>
	MATTatoi E MACELLI	<i>Bacillus anthracis; Brucella spp; Campylobacter spp, Coxiella burnetii; Clostridium tetani; Helicobacter spp; Leptospira interrogans; Listeria monocytogenes; Mycobacterium spp; Salmonella spp; Rickettsia canori, HAV, Newcastle virus; Orthomyxovirus; Papillomavirus; Poxvirus; Penicillium spp; Echinococcus spp, Toxoplasma gondii, Ascaris lumbricoides; Acari</i>
	TRASFORMAZIONE DERIVATI ANIMALI	<i>Trichophyton spp; Aspergillus spp; Acari</i>

SETTORE	ATTIVITA LAVORATIVA	AGENTE BIOLOGICO RICONTRABILE
SERVIZI SANITARIE LABORATORI DIAGNOSTICI E DI RICERCA	OSPEDALI E CASE DI CURA	<i>Bordetella pertussis; Legionella pneu mophyla; Mycobacterium spp; Neisseria meningitidis; Pseudomonas aeruginosa; Sa/monella spp; Staphylococcus aureus; Streptococcus pyogenes; HIV; HBV; HCV; Herpesvirus; Toxoplasma gondii; Acari.</i>
	LABORATORI	<i>Bacillus antracis, Bordetella pertussis; Brucella spp; Mycob éterium spp; Neisseria meningitidis; Sa/monella spp; Staphylococcus aureus; Streptococcus spp; ed altre specie batteriche; HIV; HBV; HCV; CMV ed altri ceppi virali; Funghi vari.</i>
SERVIZI DI RACCOLTA, TRATTAMENTO E SMALTIMENTO DI RIFIUTI	TRATTAMENTO E SMALTIMENTO DEI RIFIUTI SOLIDI E LIQUIDI	<i>Clostridium tetani; Escherichia coli; Leptospira interrogans; Salmone/la spp; Enterobacter spp, HAV; Enterovirus; Rotavirus, Cytomega Iovirus; Alternarla alternata; Aspergillus spp; Penicillium spp; Ascaris spp; Giardia intestina/fs.</i>
TERZIARIO	ATTIVITÀ ASSISTENZIALI, LAVORO D'UFFICIO	<i>Legionella pneumophyla; Staphylococcus spp; Rhinovirus; Virus in:fluenzali; Alternarla alternata;Aspergillus pp; Cladosporium spp; Penicillium spp; Acari.</i>
	IMPRESE DI PULIZIA E DISINFEZIONE	<i>Legionella pneumophyla; Staphylococcus spp; Streptococcus spp; HBV; HCV; HIV; Papillomavirus; Ente- rovrus; Trichophyton spp; Acari.</i>
	SCUOLA	<i>Legionella pneumophyla; Rhinovirus; Rotavirus; Aspergillus spp; Alternaria alternata; Cladosporium spp.</i>

Pericolosità dell'agente biologico

INFETTIVITA': capacità di penetrare e di moltiplicarsi nell'ospite.

PATOGENICITA': capacità di produrre malattia a seguito di infezione.

TRASMISSIBILITA': capacità di essere trasmesso da un soggetto infetto ad uno suscettibile

NEUTRALIZZABILITA': disponibilità di efficaci misure profilattiche e/o terapeutiche



Rischio biologico

- COMPARSA DI NUOVI PATOGENI
- DIFFUSIONE DI PATOGENI in nuove aree geografiche
- COMPARSA DI VARIANTI ANTIBIOTICO-RESISTENTI (uso indiscriminato di antibiotici)
- DIFFERENTI MODALITA' DI INFEZIONE
- RICOMPARSA DI AGENTI INFETTIVI (precedentemente confinati in serbatoi naturali quali piccoli mammiferi, roditori)



STIMA DELLA PERICOLOSITA' E DELLA DANNOSITÀ DEGLI AGENTI BIOLOGICI

limiti conoscitivi:

- Varietà e ubiquitarietà delle specie batteriche e virali aerodisperse;**
- Molteplicità e varietà della risposta adattativa e immunitaria dell'organismo umano;**
- mancanza di sicure relazioni dose-risposta (in risposta e in termini di contagio-infettività, per i diversi microorganismi impiegati).**



FONTI NORMATIVE

Decreto legislativo 81/08, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro (e successive modifiche ed integrazioni):

Titolo X esposizione ad agenti biologici

Capo I: Disposizioni generali: Articoli da 266 a 270

Capo II: Obblighi del datore di lavoro: Articoli da 271 a 278

Capo III: Sorveglianza sanitaria: Articoli da 279 a 281

Capo IV: Sanzioni: Articoli da 282 a 286

Allegati: da 44 a 48

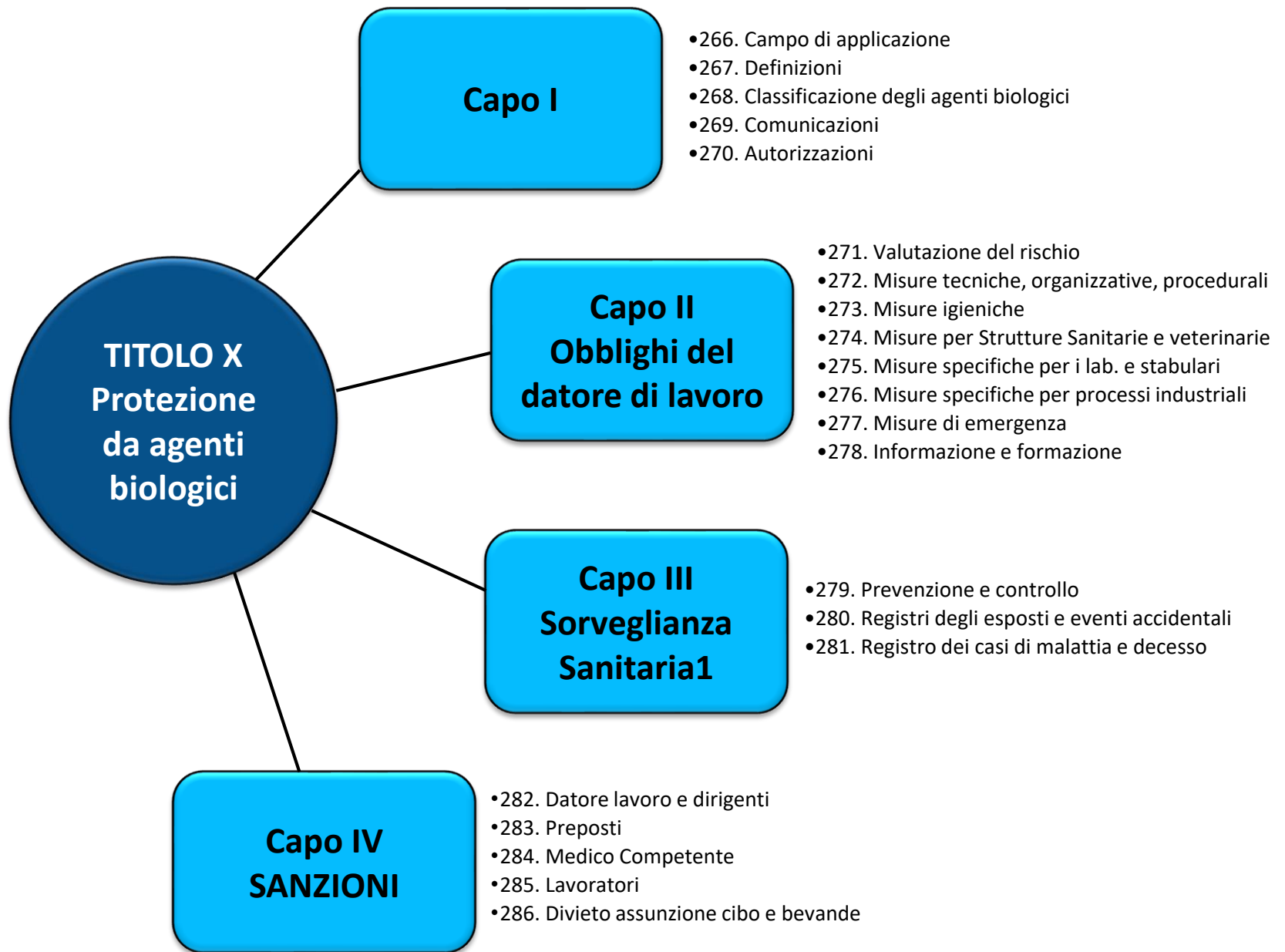
Direttiva Comunitaria 2000/54/CE del 18.09.00 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro

Decreto legislativo 201/01 impiego in ambiente confinato di MOGM

Decreto legislativo 224/03 rilascio deliberato nell'ambiente di OGM

Decreto legislativo 120/92 sulle Buone Pratiche di Laboratorio





Classificazione degli MOGM

Agente Biologico

Articolo 267 del T.U.81-08 definisce

- a) **agente biologico:** qualsiasi microrganismo anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni;
- b) **microrganismo:** qualsiasi entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o trasferire materiale genetico;
- c) **coltura cellulare:** il risultato della crescita in vitro (in appositi recipienti, come piastre o fiasche di coltura contenenti un appropriato mezzo liquido o semisolido) di cellule derivate da organismi pluricellulari



DEFINIZIONE DI MOGM

Un MicrOrganismo Geneticamente Modificato (MOGM) è “un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura per incrocio e/o ricombinazione naturale”. L’impiego confinato e l’emissione deliberata nell’ambiente di MOGM sono oggetto di specifiche disposizioni legislative

(art. 2, D.L. 206/2001)

TECNICHE DI MODIFICAZIONE GENETICA

1. Introduzione di acidi nucleici in sistemi vettore e loro inserimento in organismo ospite;
2. Introduzione diretta di materiale genetico in un microrganismo;
3. Fusione cellulare o ibridazione.



CLASSIFICAZIONE DI AGENTI BIOLOGICI MOGM CHE COSTITUISCONO UN SERIO RISCHIO PER I LAVORATORI

Impieghi confinati in impianti ad elevato livello di controllo e contenimento

Classe 4

“Alto rischio”, ovvero “Agente biologico che può causare malattie gravi in soggetti umani”;

-) può propagarsi nella comunità;
-) non sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche

(art. 2, D.L. 206/2001) (art. 268, D.L. 81/2008)

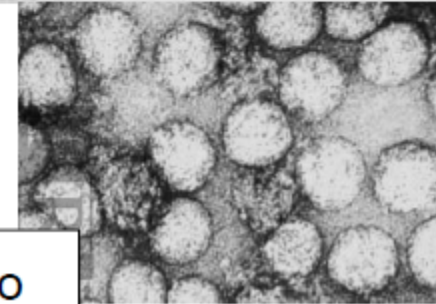
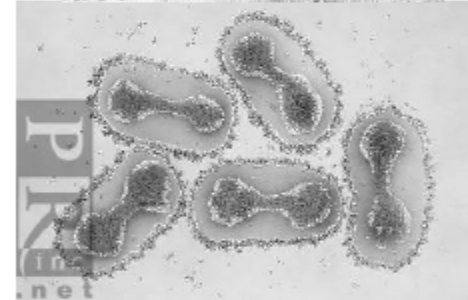


Classificazione agenti biologici

Gruppo 4

- Microrganismi in grado di provocare (trasmissione per aerosol, o ignota) gravi malattie:
 - ✓ Alastrim (*in vivo*)
 - ✓ virus febbre emorragica (Ebola)
 - ✓ virus vaiolo (*in vivo*)
 - ✓ virus encefalite da zecche
- non sono di norma disponibili efficaci misure terapeutiche o preventive (frequente esito fatale, diffusione epidemica)

Elevato rischio individuale e collettivo



CLASSIFICAZIONE DI AGENTI BIOLOGICI MOGM CHE COSTITUISCONO UN SERIO RISCHIO PER I LAVORATORI

Impieghi confinati in impianti ad elevato livello di controllo e contenimento

Classe 3

“Rischio moderato”, ovvero “Agente biologico che può causare malattie gravi in soggetti umani”

-) può propagarsi nella comunità;
-) sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche

(art. 2, D.L. 206/2001) (art. 268, D.L. 81/2008)

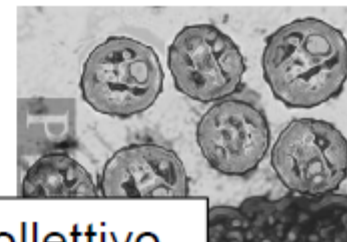
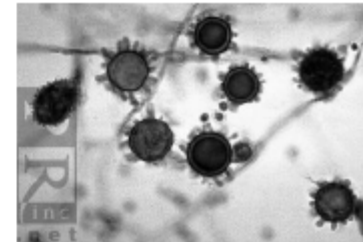


Classificazione agenti biologici

Gruppo 3



- microrganismi responsabili, in genere per inalazione, di gravi malattie
 - ✓ Batteri: *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* (tipo A), *M. tuberculosis*, *R. prowazekii*
 - ✓ Anche in Gruppo 2: *E. coli* (O157:H7), *S. typhi*
 - ✓ Funghi: *C. immitis*, *H. capsulatum*
 - ✓ Parassiti: *Schistosoma mansoni*
 - ✓ Anche in Gruppo 2: *L. donovani/braziliensis*, *P. falciparum*, *T. brucei rhodesiense*
 - ✓ Virus: febbre gialla, coriomeningite linfocitaria
 - ✓ Anche in Gruppo 2: virus epatici (E, C, G, B, D), HIV, *Rhabdovirus*, BSE
- Disponibilità di efficaci misure terapeutiche o profilattiche



Elevato rischio individuale, basso rischio collettivo



CLASSIFICAZIONE DI AGENTI BIOLOGICI MOGM CHE COSTITUISCONO UN SERIO RISCHIO PER I LAVORATORI

Quattro gruppi in funzione del rischio di infezione

Classe 2

“Basso rischio”, ovvero “MOGM che possono causare malattie in soggetti umani”;
-) è poco probabile che si propaghino nella comunità;
-) sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche

Impieghi confinati nei laboratori

(art. 2, D.L. 206/2001)

(art. 268, D.L. 81/2008)



CLASSIFICAZIONE DEGLI AGENTI BIOLOGICI MOGM

impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Classe 2

“Basso rischio”, ovvero “Agente biologico che può causare malattie in soggetti umani”;

-) è poco probabile che si propaghi nella comunità;

-) sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche

Klebsiella pneumoniae (infezioni a carico dell'apparato urinario e del tratto respiratorio)

Legionella pneumophila (polmonite)

Enterobacter aerogenes (infezione al tratto urinario umano)

.....

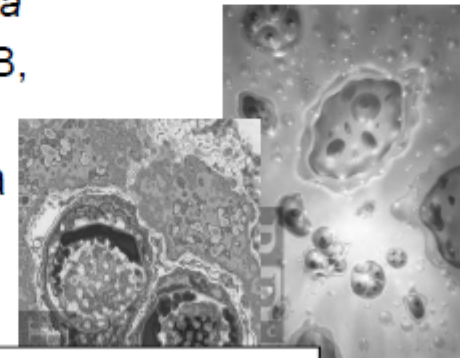
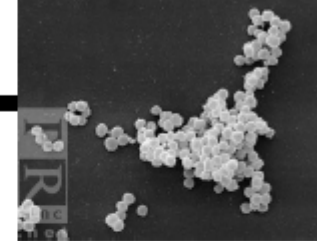
(art. 2, D.L. 206/2001)(art. 268, D.L. 81/2008)



Classificazione agenti biologici

Gruppo 2

- organismi sufficientemente pericolosi per l'uomo e la collettività:
 - ✓ Batteri: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium*.
 - ✓ Funghi: *C. albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Tricophyton spp*
 - ✓ Parassiti: *G. intestinalis*, *T. gondii*, *E. histolytica*
 - ✓ Virus: virus esantematici, virus influenzali (A, B, C), *Herpesvirus* (CMV, EBV)
- trasmissione per contatto, ingestione, puntura
- disponibilità di efficaci misure profilattiche o terapeutiche



Moderato rischio individuale, basso rischio collettivo



CLASSIFICAZIONE DI AGENTI BIOLOGICI MOGM CHE COSTITUISCONO UN SERIO RISCHIO PER I LAVORATORI

Quattro gruppi in funzione del rischio di infezione

Classe 1

“Rischio nullo o trascurabile”, ovvero “MOGM che presentano poche probabilità di causare malattie in soggetti umani”

Impieghi confinati nei laboratori del Dipartimento Bioscienze Biotecnologie e Biofarmaceutica (Palazzo Farmacia)

(art. 2, D.L. 206/2001)

(art. 268, D.L. 81/2008)



CLASSIFICAZIONE DEGLI AGENTI BIOLOGICI MOGM

impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Classe 1

“Rischio nullo o trascurabile”, ovvero

“Agente biologico che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani”

Saccharomyces Cerevisiae

Streptococcus Thermophilus

Lactobacillus lactis

Staphylococcus xylosus

E. coli

.....

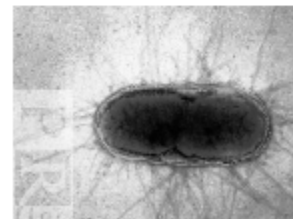
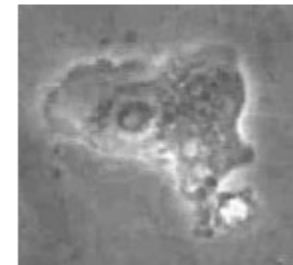
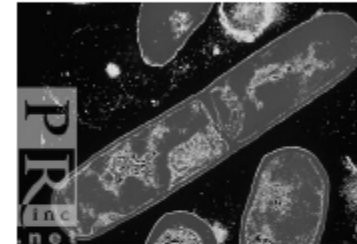
(art. 2, D.L. 206/2001)

(art. 268, D.L. 81/2008)

Classificazione agenti biologici

Gruppo 1

- Organismi scarsamente pericolosi (per lo più opportunisti) per l'uomo e la collettività:
 - ✓ *Bacillus subtilis*
 - ✓ *Naegleria gruberi*
 - ✓ *Escherichia coli* K12 (non enteropatogeno)
 - ✓ *Saccharomyces cerevisiae*
- La manipolazione non richiede misure speciali di protezione e prevenzione



Nessuno o basso rischio individuale e collettivo

Agente Biologico

Classificazione agenti biologici (*Articolo 268, allegato XLVI*):

Agente biologico di gruppo 1: ha poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;

Agente biologico di gruppo 2: può causare malattie in soggetti umani e costituisce un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;

Agente biologico di gruppo 3: può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità. Sono disponibili misure efficaci profilattiche o terapeutiche;

Agente biologico di gruppo 4: può provocare gravi malattie in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

L'ALLEGATO XLVI riporta l'elenco degli agenti biologici classificati nei gruppi 2, 3 e 4.

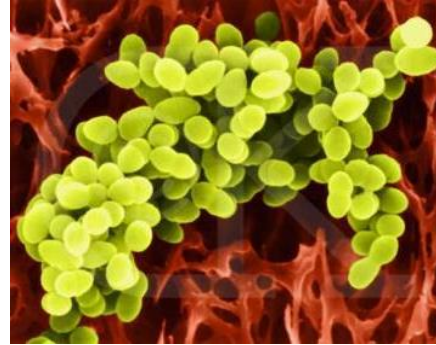


MOGM DI CLASSE 1 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Ceppi batterici non patogeni



Escherichia coli



Lactococcus lactis

Attività di ricerca

Produzione e isolamento di plasmidi contenenti opportuni geni che possono essere utilizzati per trasformazioni di colture cellulari batteriche e di lievito o trasfezioni di colture cellulari di mammifero

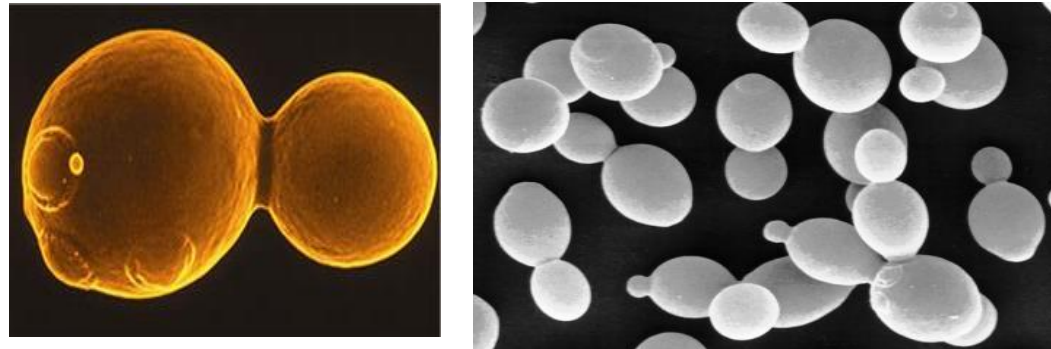
Produzione e isolamento di proteine non patogene ricombinanti per studi funzionali in vitro

Fermentazioni per la produzione di prodotti di vario interesse



MOGM DI CLASSE 1 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*



Attività di ricerca

Produzione e isolamento di proteine non patogene ricombinanti per studi funzionali in vitro

Studio di mutanti di lievito come modello per patologie umane,

Overespressione di proteine endogene per studi di localizzazione subcellulare

Caratterizzazione del ceppo produttore e brevettazione del microrganismo e/o processo

Selezione ceppi alto-produttori (es. mutagenesi)

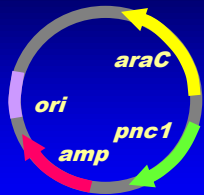


MOGM DI CLASSE 1 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

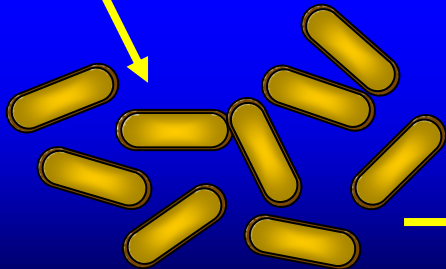
Produzione di proteine ricombinanti

Procedura sperimentale

Vettori plasmidici



trasformazione



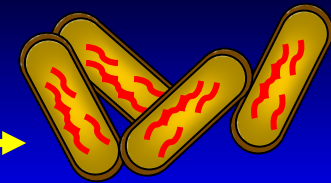
batteri



Crescita su terreni selettivi



separazione e rottura delle cellule



proteina ricombinante

Cellule lisate

Studi funzionali

Rifiuti biologici di classe 1

Rifiuti biologici solidi CER. 180103

Rifiuti biologici liquidi CER. 180103





MOGM DI CLASSE 1 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Laboratori per colture batteriche *Escherichia coli*

dispositivi di protezione individuali (camice, guanti);

Manipolazione in condizioni di sterilità (bunsen, cappe microbiologiche);

Plastiche sterili monouso (pipette, puntali);



Sterilizzazione ad hoc di vetreria (beute, pyrex, fiasche), soluzioni, medium di coltura



Incubatori/shakers termostatici per microbiologia.



MOGM DI CLASSE 1 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Laboratorio per colture di *Saccharomyces cerevisiae*

dispositivi di protezione individuali (camice, guanti);

Plasticheria sterile monouso (pipette, puntali);

Manipolazione in condizioni di sterilità (cappe microbiologiche);



Sterilizzazione ad hoc di vetreria (beute, pyrex, fiasche), soluzioni, medium di coltura;

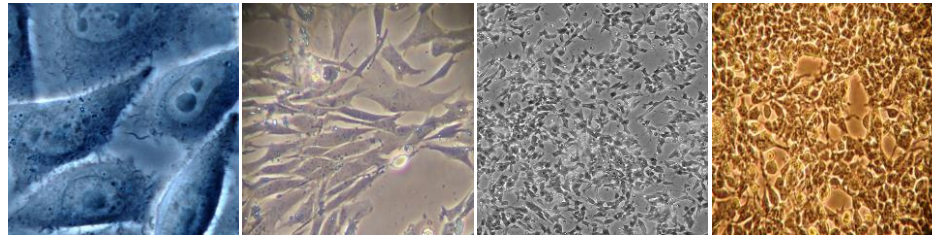


Camera di coltura termostata per microbiologia



MOGM DI CLASSE 1 e 2 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Colture cellulari secondarie di mammifero



CHO

Fibroblasti

HeLa

Hek

Attività di ricerca

Studi sul ruolo funzionale di geni non patogeni in modelli cellulari di mammifero mediante overespressione e/o silenziamento genico



I laboratori in cui si effettua **manipolazione di colture cellulari** sono ambienti adibiti alla manipolazione di cellule utilizzate per esperimenti in vitro, cioè al di fuori di organismi viventi.

La manipolazione può avvenire anche nelle ***cell factories***, ambienti più sofisticati a contaminazione controllata, in cui cellule prelevate da un donatore o da un paziente vengono manipolate in vitro seguendo le *Good Manufacturing Practice (GMP)* e poi **(re)inoculate nel paziente**, garantendo la sicurezza dello stesso e l'efficacia della terapia.



Tipologie di coltura cellulare.

Coltura primaria	Cellule derivanti direttamente da una biopsia del tessuto di origine (ad es. coltura di cheratinociti da biopsia di pelle). Presentano crescita e sopravvivenza limitate.
Linee cellulari continue	Derivate da coltura primaria e costituite da un singolo tipo di cellule che può essere replicato, in coltura, un numero definito o indefinito di volte.
Coltura cellulare stabilizzata	Cellule che possono essere mantenute e fatte crescere in coltura indefinitamente (c.d. cellule “immortalizzate” - per mutazione spontanea o indotta da radiazioni, virus o sostanze chimiche - che possono replicarsi indefinitamente in coltura).
Colture clonali	Colture ottenute per mitosi di una singola cellula. Si usano quando è richiesta un’elevata omogeneità cellulare.



Rischi in un laboratorio di colture cellulari

In generale, i rischi a cui si è esposti nei laboratori ove si effettua manipolazione di colture cellulari sono conseguenti a situazioni di pericolo derivanti da:

- utilizzo di sostanze nocive nei protocolli di manipolazione delle colture cellulari (tossiche, cancerogene, etc.)
- utilizzo di sostanze esplosive e/o infiammabili (alcooli, azoto liquido);
- utilizzo di agenti biologici pericolosi (virus per infettare le cellule in colture);
- utilizzo di apparecchiature di lavoro specifiche, (centrifughe, agitatori, autoclavi, ecc.);
- caratteristiche strutturali, arredi, organizzazione degli spazi e delle modalità di lavoro inadeguati;
- carenze a livello di formazione, informazione ed addestramento degli operatori, nonché di procedure scritte.

In letteratura sono riportati diversi casi di “infezioni acquisite in laboratorio” (*Laboratory Acquired Infections*, LAI) a causa dell’emissione di aerosol conseguente alla rottura di contenitori nel corso di centrifugazioni ad alta velocità, al trasporto senza utilizzo di guanti di provette contenenti ceppi patogeni, oppure all’involontaria inoculazione nell’operatore di materiale biologico infetto.

Numerose indagini epidemiologiche hanno evidenziato che gran parte degli incidenti verificatisi nei laboratori di questo tipo sono conseguenti a disattenzione o mancata applicazione delle procedure di sicurezza.

Regole di base da seguire nel laboratorio di colture cellulari.

Usare sempre camice e guanti.

Fortemente raccomandato uso di materiale in plastica monouso

Pulire tutte le superfici prima di ogni operazione e tra operazioni diverse (o diverso operatore) con disinfettante

Identificare in maniera chiara tutti i contenitori che si usano

Lavorare tutti i campioni sotto cappa

Tenere in ordine e mantenere la superficie della cappa il più possibile sgombra da oggetti

Maneggiare una sola linea cellulare alla volta

Verificare l'assenza nei terreni di contaminazione o di altre alterazioni

Rispettare le scadenze di pulizia e di controllo di incubatore e cappa biologica



I vettori virali usati per il trasferimento del materiale genetico in genere contengono anche un gran numero di geni derivanti da microrganismi patogeni come batteri, virus ed altri parassiti e la maggior parte di essi, non essendo naturali, può dunque rappresentare un potenziale pericolo per l'ambiente e per la salute umana. Tali vettori penetrano nelle cellule bersaglio attraverso un meccanismo di vera e propria "infezione", trasferendo il gene terapeutico attraverso i loro naturali meccanismi biologici.

I vettori virali più utilizzati derivano da *virus (retrovirus, adenovirus ed herpesvirus)* caratterizzati da una relativa semplicità genetica e dalla proprietà di infettare con alta efficienza molti tipi di cellule. Le problematiche legate alla sicurezza nell'utilizzo e nella manipolazione dei vettori virali sono evidenti nel momento in cui tali virus sono in grado di infettare cellule umane.



Esempi di norme minime di buona prassi da adottare.

Manipolazione cellulare:

- È necessario considerare tutti i campioni e i tessuti provenienti da esseri umani come potenziali portatori di agenti patogeni e manipolarli in una cappa di sicurezza biologica di Classe II.
- Le porte del laboratorio devono rimanere sempre chiuse durante lo svolgimento delle attività lavorative.
- L'accesso al laboratorio deve essere consentito, esclusivamente, alle persone autorizzate ed adeguatamente istruite.
- Tutti i tessuti e le coltivazioni cellulari che ne risultano devono essere lavorate in modo asettico utilizzando materiali e strumenti sterili.
- Nei locali destinati alle colture di cellule per utilizzo clinico dovranno essere garantite condizioni tali da impedire contaminazioni crociate fra cellule di origine diversa (separazione fisica e/o temporale delle diverse colture).

1. le fonti di pericolo - anche solo potenziale, che possono essere:

- a.* colture cellulari e materiale d'uso ad esse correlato (terreni di coltura, sieri, supplementi, enzimi);
- b.* strumentazione utilizzata (centrifughe, frigoriferi, incubatori);
- c.* aree di lavoro (cappe biologiche, banconi di laboratorio);
- d.* rifiuti prodotti;
- e.* dispositivi di protezione necessari;

2. le fasi critiche delle attività di lavoro (tipologia e frequenza di svolgimento):

- a.* apertura di contenitori di campioni potenzialmente infetti
- b.* manipolazione di aghi e bisturi
- c.* uso di sostanze tossiche
- d.* centrifugazioni, omogeneizzazioni di materiale biologico o altre operazioni a rischio di produzione di bioaerosol;

3. i soggetti esposti, con particolare riguardo alle categorie sensibili



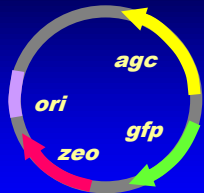
MOGM DI CLASSE 1 e 2 impiegati nel Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare

Rifiuti biologici solidi CER. 180103

Rifiuti biologici liquidi CER. 180103

Procedure sperimentali

vettori plasmidici



trasfezione

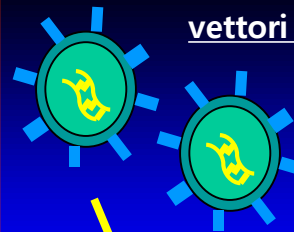


cellule di mammifero

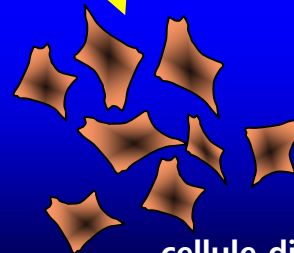
Rifiuti biologici di Classe 1

Studi funzionali

vettori virali



trasduzione



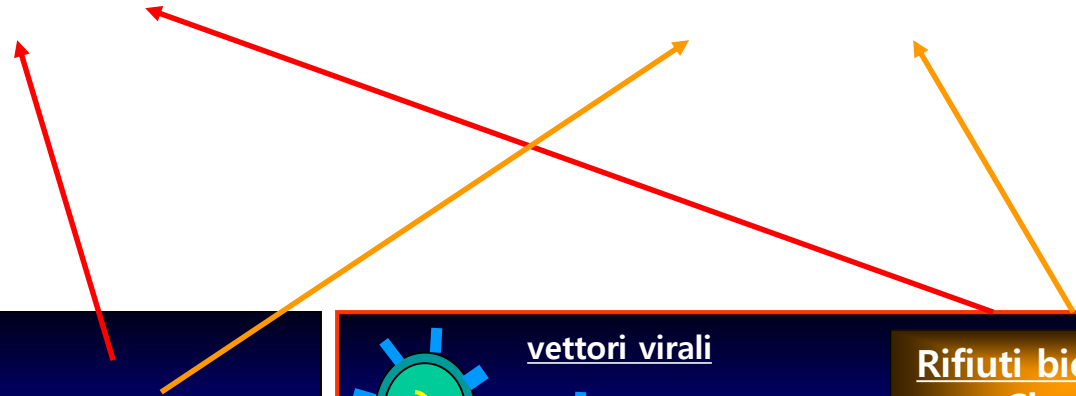
cellule di mammifero

Rifiuti biologici di Classe 1

inattivazione

Rifiuti biologici di Classe 2

Studi funzionali



Le cellule possono essere infettate da agenti patogeni per l'uomo. La contaminazione da batteri e funghi è facilmente verificabile (visibile all'osservazione al microscopio), semplice da prevenire e trattare (antibiotici-antimicotici), mentre quella da virus è difficile da diagnosticare

Proprietà intrinseche delle cellule e rischio correlato (il rischio aumenta procedendo in tabella dall'alto verso il basso) (PAUWELS K., 2006).

Fonte (specie di origine)	Tipo cellulare o tessuto	Tipo di coltura
Cellule di uccelli o invertebrati	Cellule epiteliali e fibroblasti	Linee cellulari ben caratterizzate
Cellule di mammifero (non primati)	Mucosa intestinale	Linee cellulari continue
Cellule di primati non umani	Endotelio	Cellule primarie
Cellule umane	Cellule neuronali Cellule ematopoietiche	

Contenimento degli

MOGM e

Procedure per la

sicurezza

MISURE DI CONTENIMENTO, PREVENZIONE E PROTEZIONE DA MOGM

laboratori

Isolamento

Accessi via zone filtro

Pressione negativa interna

Ultrafiltrazione aria (filtri HEPA)

Esposizione segnale di pericolo biologico

Superfici resistenti

Accesso limitato

Formazione del personale

Livello 1

non necessario

non necessario

non necessario

non necessario

non necessario

necessario/bancone

non necessario

necessario

Livello 2

non necessario

non necessario

non necessario

non necessario

necessario

necessario/bancone

necessario

necessario

strumentazioni

Cappe di sicurezza (micro)biologica

Autoclave

Apparati di lavaggio e decontaminazione

Deposito sicuro per MOGM

Indumenti protettivi (camice/guanti)

(non) necessario
nell'edificio

necessario

non necessario

(non) necessario

necessario

nell'edificio

necessario

necessario

necessario

pulizia/rifiuti

Procedure di disinfezione

Inattivazione dei rifiuti MOGM

necessario

non necessario

necessario

necessario

Zona Colture cellulari

Rischio biologico, movimentazione manule dei carichi (Bombole CO₂ esposizione ad UV)

Frigoriferi e freezer:

rischio incendio, rischi biologici e chimici, rischi infortunistici)

Reagentario

Rischio di esposizione, incompatibilità, infortuni

Organizzazione

Macchinari e strumentazione

Rischi vari: elettrici, meccanici, chimici fisici

Banconi:

(rischi vari dovuti anche all'affollamento e alle operazioni che vi si svolgono).

Zone Computer

Rischio ergonomico

Cappa Chimica:

(rischi dovuti alla cattiva gestione)

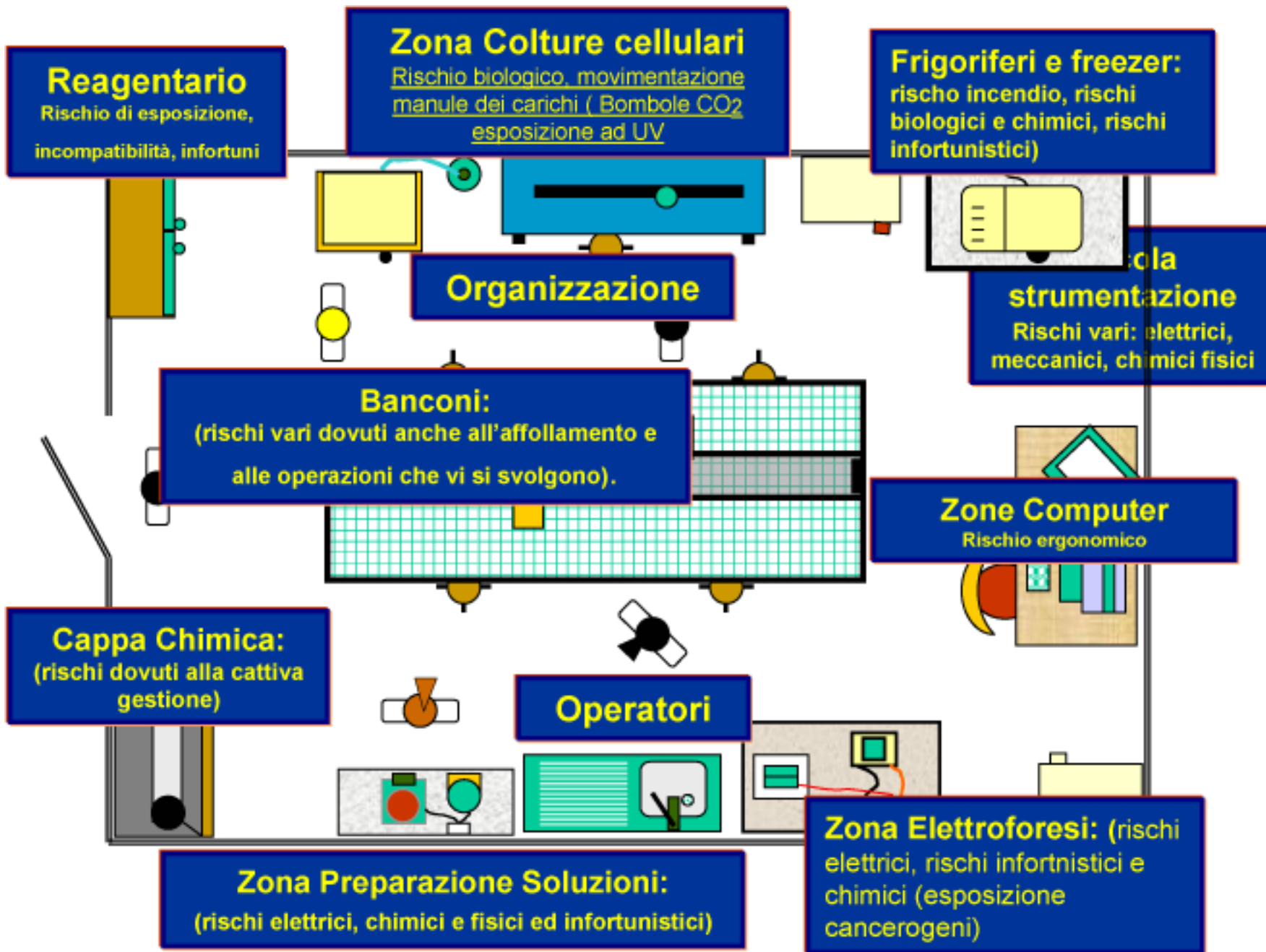
Operatori

Zona Elettroforesi:

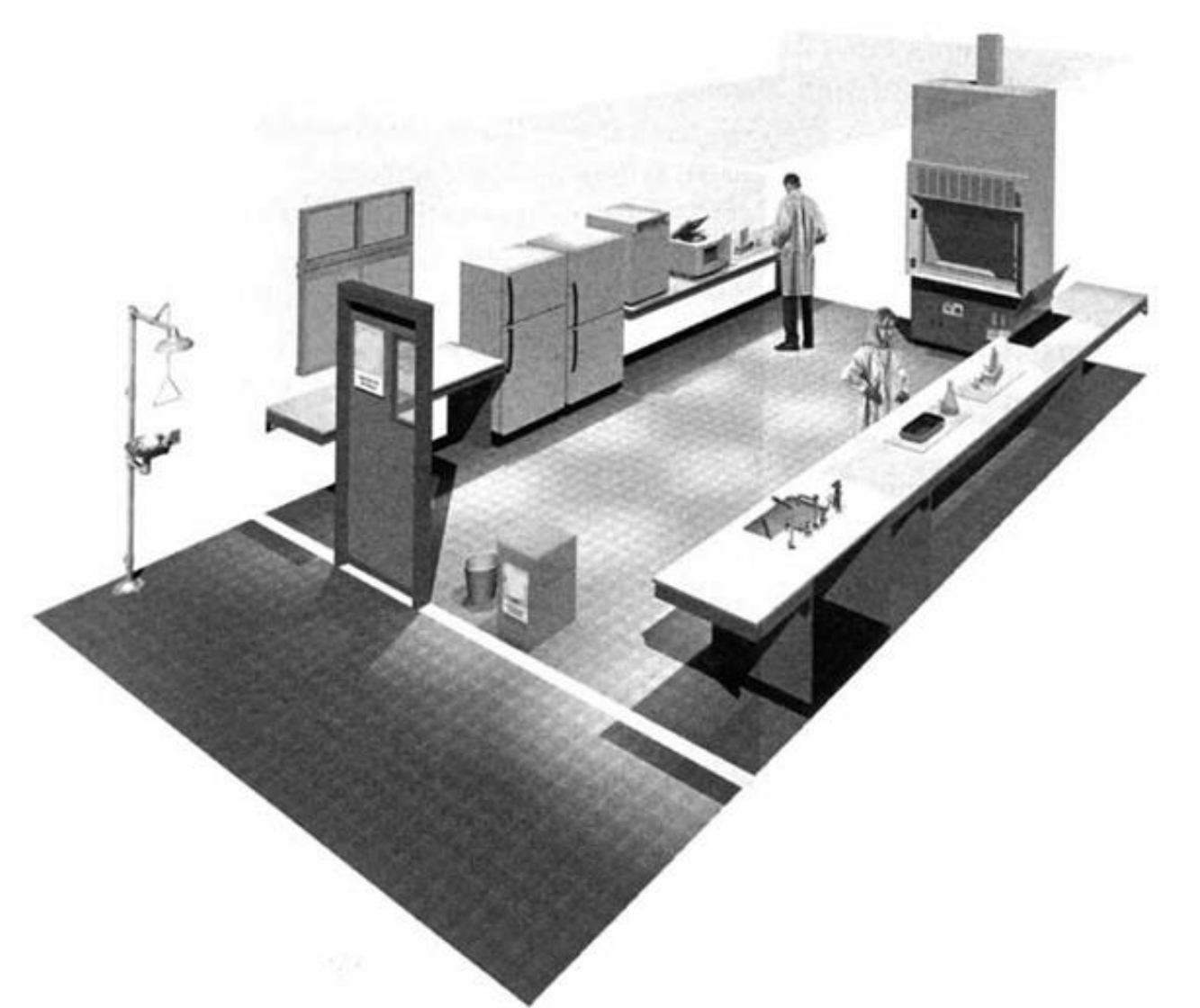
(rischi elettrici, rischi infortunistici e chimici (esposizione cancerogeni)

Zona Preparazione Soluzioni:

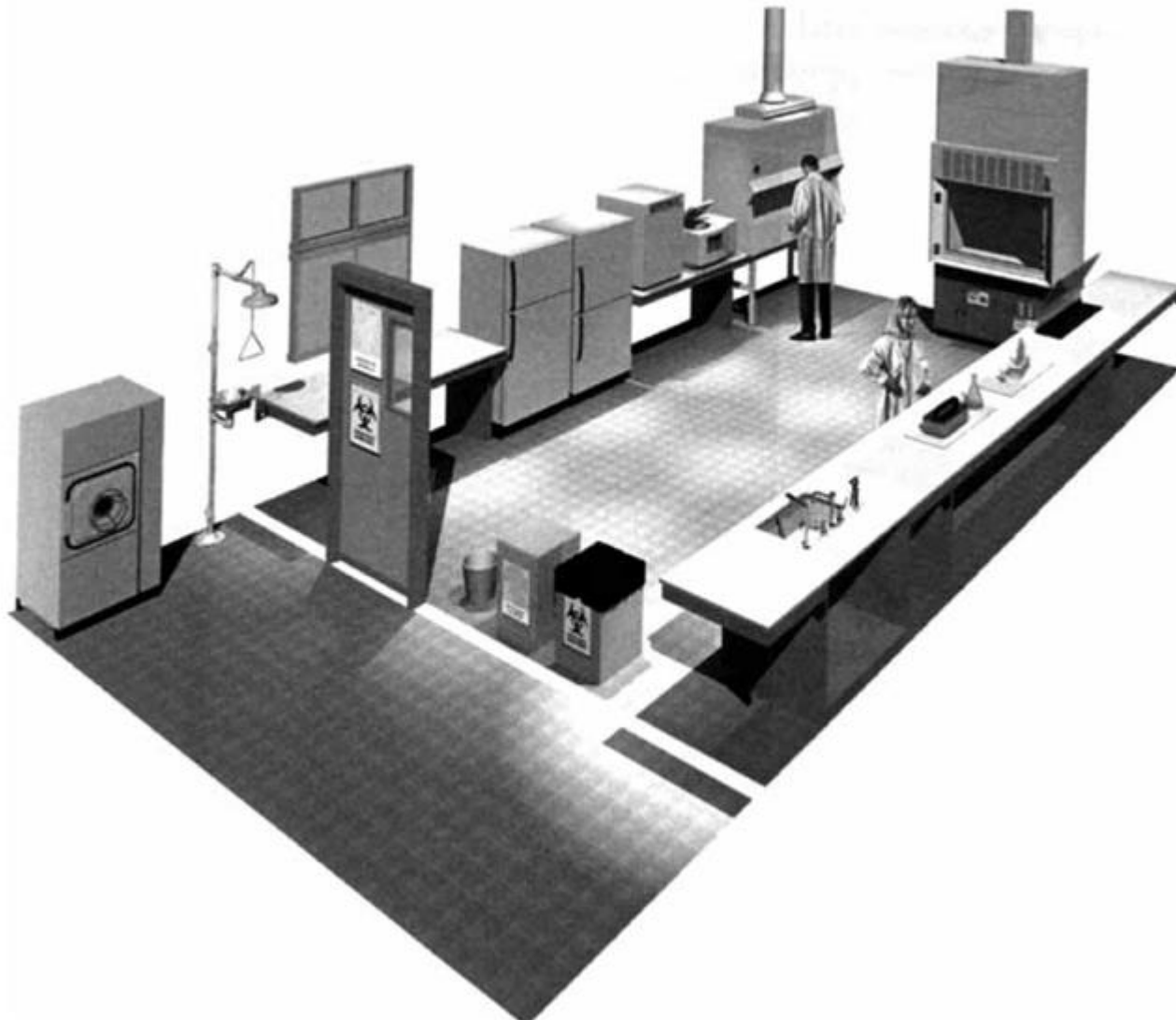
(rischi elettrici, chimici e fisici ed infortunistici)



Laboratorio di sicurezza di classe 1



Laboratorio di sicurezza di classe 2



Procedure per la sicurezza

PROCEDURE DI EMERGENZA IN LABORATORIO

All'atto della comunicazione di emergenza che preveda l'abbandono del locale laboratorio

1. Spegnerle le apparecchiature
2. Chiudere le cappe chimiche
3. Chiudere le cappe biologiche
4. Chiudere la finestra
5. Avisare tutti coloro che lavorano nel laboratorio anche se non sono al momento presenti (si sono allontanati per brevi istanti)



PROCEDURE DI EMERGENZA IN LABORATORIO

Spargimento di liquidi sul piano di lavoro della cabina di sicurezza biologica

Portare la ventilazione della cabina alla massima velocità.
Indossare guanti e mascherina protettiva e disinfettare le superfici.

Trasferire tutto il raccolto, unitamente a guanti e maschera, in sacchetto termoresistente. Sterilizzare in autoclave.

N. B.: se è stato usato ipoclorito di sodio come disinfettante, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi.



Spargimento di liquidi biologici sul pavimento

Chiudere la porta a chiave vietando l'accesso ad estranei.
Indossare guanti e mascherina protettiva.

Neutralizzare ed assorbire il liquido con l'apposita polvere e lasciare agire per 30 minuti oppure coprire il liquido con carta assorbente sulla quale versare un disinfettante adeguato e lasciarlo agire per 30 minuti.

Raccogliere la polvere con l'apposita paletta monouso o la carta assorbente con delle pinze con manico lungo, inserire in un sacchetto da autoclave ed avviare all'autoclave.

N. B.: se è stato usato ipoclorito di sodio, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi



Disinfezione e Sterilizzazione

Disinfezione: **impiego di mezzi fisici o chimici che uccidono i microorganismi, ma non necessariamente le spore**

Sterilizzazione: **processo che uccide tutte le classi di microorganismi**

Decontaminazione: **qualsiasi processo in grado di uccidere microorganismi**



Disinfezione

Ipoclorito di sodio: da diluire con acqua per preparare miscele a varie concentrazioni di cloro libero

Alcoli: L'alcol etilico e l'alcol isopropilico hanno la stessa proprietà disinfettante; sono attivi contro batteri, funghi, virus, ma non contro le spore.

La miglior efficacia si ha con diluizione del 70%.



CONSIDERAZIONI SULL'IPOCLORITO DI SODIO - 1

L'**ipoclorito** commerciale (candeggina) contiene il 5% di Cl attivo nominale. Purtroppo l'ipoclorito è instabile e la concentrazione di cloro tende a diminuire nel tempo, specialmente se la soluzione è esposta alla luce ed al calore.

In genere, i prodotti formulati per l'uso domestico, insieme all'ipoclorito contengono sostanze stabilizzanti che ne favoriscono la conservazione. In ogni caso, le soluzioni di ipoclorito devono essere mantenute al riparo della luce diretta del sole e in un luogo fresco.



CONSIDERAZIONI SULL'IPOCLORITO DI SODIO - 2

In condizioni non idonee, la degradazione dell'ipoclorito è molto rapida; dopo **20-30'** la decomposizione ha inizio e tale evento può rendere vane le operazioni di disinfezione a causa della bassa concentrazione di principio attivo nelle soluzioni disinfettanti utilizzate.

Poiché l'unico modo per conoscere esattamente la concentrazione di cloro attivo nell'ipoclorito è attraverso la titolazione analitica, che non è praticabile routinariamente, si consiglia di utilizzare per la disinfezione ipoclorito prelevato da confezioni aperte di recente e conservato ben chiuso ed al fresco e di **non preparare in anticipo** la soluzione con concentrazione al 2-3% di Cl attivo.

Per l'uso nel trattamento di rifiuti biologici liquidi, prima di aggiungere i rifiuti versare nel contenitore apposito una quantità della soluzione di ipoclorito (preparata fresca) pari al 20% del volume del contenitore.



Sterilizzazione

Ciclo di sterilizzazione normalmente utilizzato: 20 minuti 121°C

Uso e precauzioni nell'uso di autoclavi

- Leggere attentamente il manuale d'istruzione;
- Controllare che i cavi elettrici e le spine siano in ottime condizioni;
- Gli oggetti da sterilizzare non vanno ammassati per consentire la circolazione del vapore;
- Le buste per autoclave vanno tenute aperte;
- Non sterilizzare prodotti chimici e liquidi corrosivi o infiammabili;
- Eseguire manutenzioni ordinarie e straordinarie;
- Aprire l'autoclave solo quando la T è al di sotto di 80°C, proteggendo mani, viso e braccia



elementi fondamentali del contenimento

procedure



attrezzature e
dispositivi



misure costruttive



procedure nei laboratori: le buone pratiche

- punti fondamentali

- igiene personale



- pulizia dell'ambiente



- consumo di alimenti e bevande

- fumo



Grazie per l'attenzione

Grazie per l'attenzione