

Esempi pratici di procedure In un laboratorio biologico di contenimento 2

13 Dicembre 2022
MILANO

Istituto di Biologia e Biotecnologia

Agraria - CNR



SANTA LUCIA
NEUROSCIENZE
E RIABILITAZIONE

Annalisa Tassone PhD
a.tassone@hsantalucia.it



“Procedure in camera di contenimento di livello 2”

- I MOGM per essere utilizzati in BSL2 devono essere espressamente autorizzati attraverso una presentazione di una notifica al Ministero della Salute
- Le persone devono essere autorizzate ed addestrate, attenendosi alle procedure

Parte riservata al
Notificante:
N° notifica impianto.....
Data.....
(come da punto IB)

Parte riservata al
Ministero della Salute
Data di ricevimento.....
N° della notifica.....

Notifica di impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM)¹ secondo il Decreto legislativo 12 Aprile 2001 n. 206

MODULO PER IMPIEGHI DI CLASSE 2

I) Informazioni generali

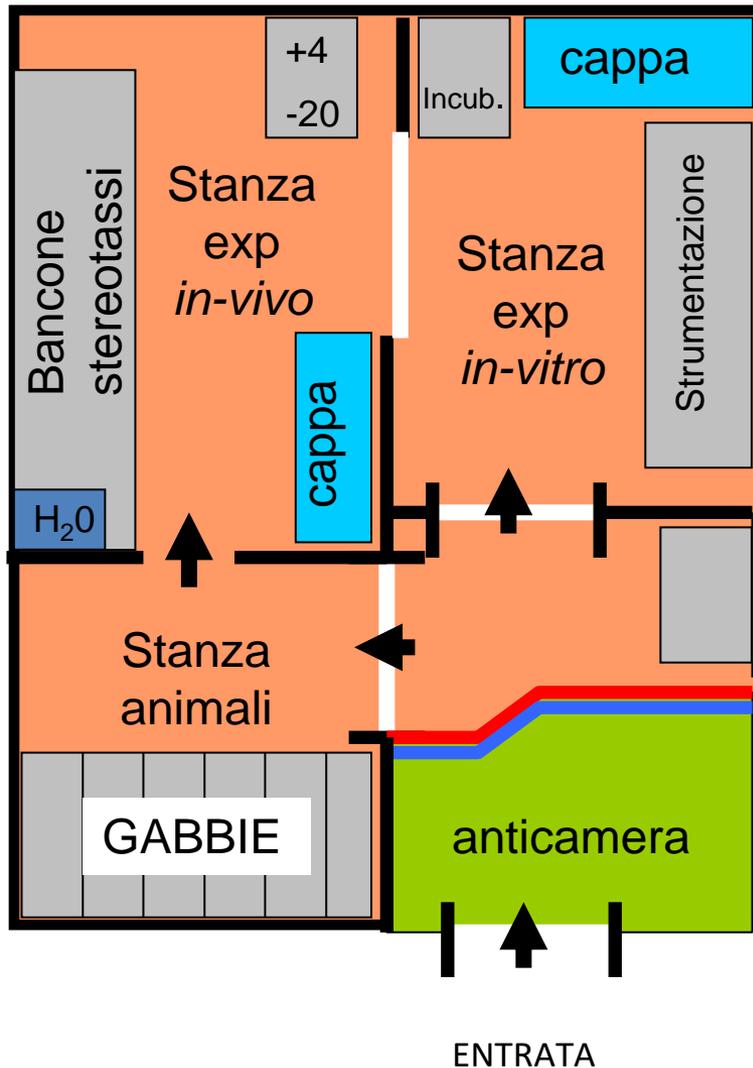
A) Notificante

- 1) Nome e qualifica dell'utilizzatore² (allegare curriculum vitae³).....
- 2) Istituzione o Società di appartenenza.....
- 3) Indirizzo.....
- 4) Persona da contattare.....
Tel.....
E-mail..... PEC.....



“Procedure in camera di contenimento di livello 2”

Esempio

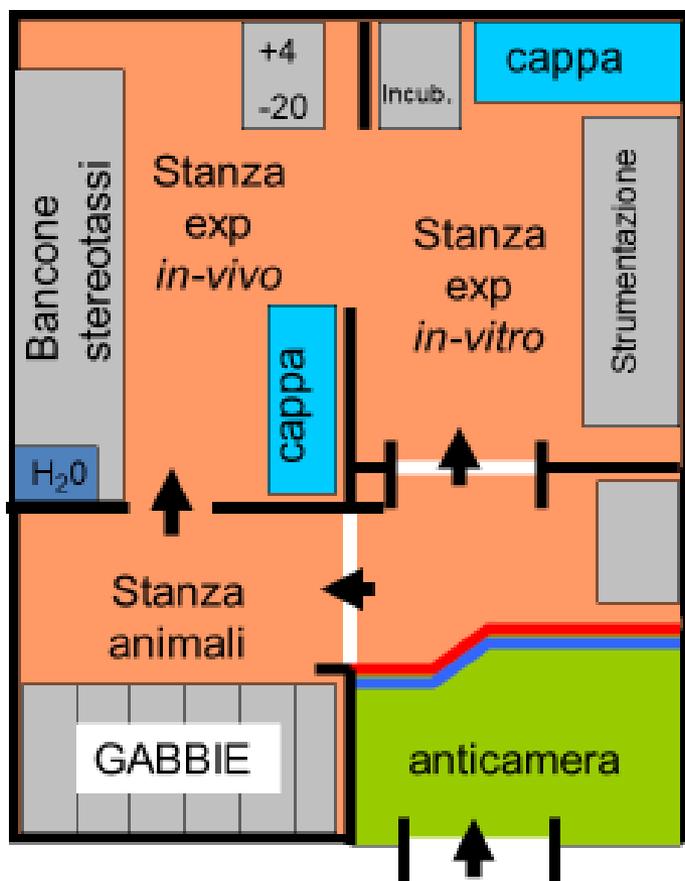


Accesso solo ad operatori
addestrati e formati

“Procedure in camera di contenimento di livello 2”

Accesso solo ad operatori addestrati e formati

Ad ogni utilizzo va compilato il **registro delle operazioni** indicando:



Registro delle operazioni

- ✓ Data
- ✓ Nome dell'operatore
- ✓ Tipo MOGM utilizzato
- ✓ Quantità (volume)
- ✓ Tipo di operazione effettuata
- ✓ Eventuali problemi riscontrati (incidenti, near miss, altre problematiche)

Procedure di accesso alla BSL2

Entrata

Nell'antistanza delimitata dal nastro azzurro/rosso, indossare:

- 2 paia di guanti
- cuffietta e mascherina
- camice dedicato (usa e getta)
- copriscarpe dedicato (usa e getta)



Anticamera



Uscita

Prima di uscire:

- ✓ eliminare il paio di guanti esterno
- ✓ togliere il camice
- ✓ togliere sovrascarpe
- ✓ prima di uscire dall'anticamera togliere ultimo paio di guanti

N.B. Telefono non è permesso!!! Si può usare il telefono presente in stanza solo dopo aver tolto il guanto esterno.



Utilizzare solo DPI adatti per l'uso specifico nell'area BSL2.

Non usare normali camici da laboratorio

Per la protezione del viso da schizzi, aerosol, polveri, si possono utilizzare visiere facciali costituite da calotte a cui viene applicato uno schermo trasparente



o le maschere facciali (naso-bocca o per il viso), che possono montare filtri di varie tipologie



Produzione di MOGM

Incubatore, cappa, ultracentrifuga, centrifuga, microscopio (munito di lampada a fluorescenza) autoclave **dedicati**



Produzione di MOGM

Per la produzione di vettori virali:

- l'accesso è limitato agli operatori con una buona manualità sotto cappa
- usare puntali e pipette con filtro
- evitare l'uso di materiale di vetro, siringhe o oggetti taglienti
- evitare di fare bolle o aerosol
- lavorare sotto cappa con un contenitore dei rifiuti contenente ipoclorito di sodio

Produzione di MOGM

Il materiale da riutilizzare viene immerso in ipoclorito di sodio per almeno 30', successivamente viene spostato nell'apposito sacchetto ed autoclavato

A fine lavoro:

- passare tutte le superfici con EtOH 70% o VIRKON;
- svuotare l'ipoclorito nella tanica
- autoclavare il materiale da smaltire nel sacchetto rosso, poi inserirlo nel contenitore dei rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo
- chiudere la cappa ed accendere gli UV tra un utilizzo ed il successivo



Traffico interno/esterno:

- Evitare lo spostamento di oggetti dentro/fuori la BSL2
- Se necessario, gli oggetti possono essere portati fuori solo dopo accurate disinfezione con EtOH 70% o VIRKON.
- Lasciare nella BSL2 fogli e quaderni

Produzione di MOGM

1-TRASFEZIONE dei costrutti per la produzione dei vettori virali

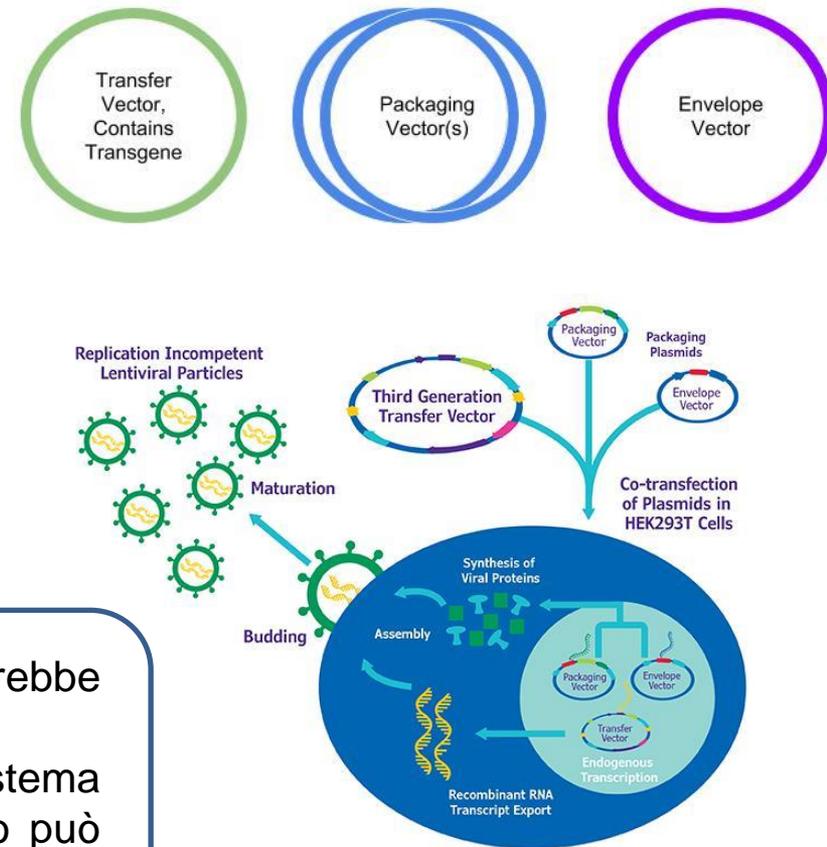
Mix di trasfezione

Il mix di plasmidi utilizzato per produrre un MOGM è un sistema “helper free”: manca del sistema di sintesi delle proteine, fornito dalla cellula ospite.

Quindi qualunque cellula vivente in cui sia presente questa combinazione di plasmidi potrebbe rappresentare una “packaging cell” consentendo al virus di amplificarsi.

Teoricamente anche la cellula del tuo corpo potrebbe funzionare da cellula packaging.

In ogni caso ci potrebbe essere una risposta sistema immunitario o agire da tumorigenico (il virus stesso può essere ingegnerizzato per esprimere un oncogene)



Produzione di MOGM

2-Raccolta virus e stoccaggio a -80°C

Le cellule possono essere estratte dall'incubatore usando un secondo contenitore chiuso per portarle nella cappa biologica

- attenzione in generale a non produrre bolle ed aerosol
- per sgombrare la cappa, pulire con ETOH 70% o Virkon tutte le superfici degli oggetti da rimuovere
- chiudere bene i tappi per l'uso in ultracentrifuga
- le cellule usate per la produzione del MOGM vengono distrutte con ipoclorito di sodio (almeno 30')

Il MOGM può essere aliquotato e riposto a -80°C in provette ben chiuse, previa disinfezione della superficie esterna di tutti i tubi con EtOH 70% o Virkon e spostamento in un contenitore chiuso.

Produzione di MOGM

3-Infezione di colture cellulari *in vitro*

Le cellule infettate possono:

- essere sottoposte a trattamento con **detergenti** (es. estratti proteici), possono essere trattate con agenti fissanti come **paraformaldeide** (es. immunofluorescenza). In entrambi i casi le cellule così trattate sono considerate **prive di rischio biologico** e posso essere portate fuori dalla BSL2 (previa disinfezione del contenitore con EtOH70% o Virkon).
- le cellule possono essere eliminate con ipoclorito di sodio (almeno 30 minuti).
- se proprio è necessario le cellule infettate possono essere portate fuori dalla BSL2 dopo almeno 7 giorni dall'infezione. Sarebbe buona norma usare dei kit in grado di riconoscere la presenza di virus ancora attivo nelle nostre colture cellulari infettate prima di portarle fuori dalla BSL2.



HIV-1 p24 Antigen ELISA



EnzChek[®] Reverse Transcriptase Assay Kit (E-22064)

Utilizzo di modelli animali

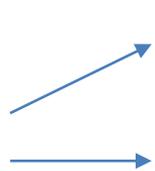


Utilizzo di modelli animali

D.Lgs 26/2014



Allegato VI



ISS

Ministero della Salute

Autorizzazione protocollo

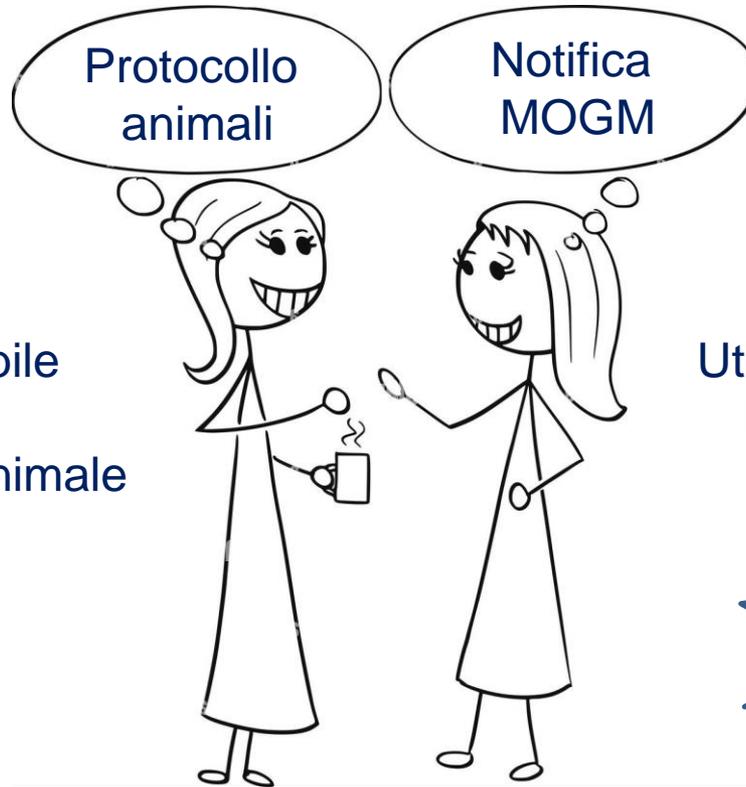
Punto 23.
Indicare eventuali rischi
per l'operatore

Protocollo
animali

Notifica
MOGM

Responsabile
del
Benessere animale

Utilizzatore
MOGM



Comunicazione

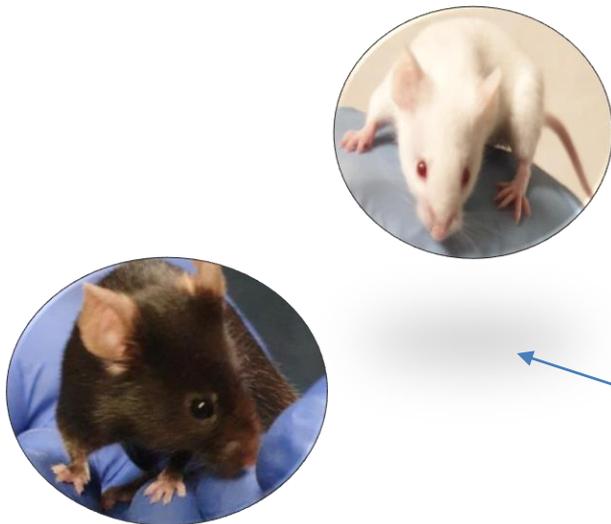


Collaborazione

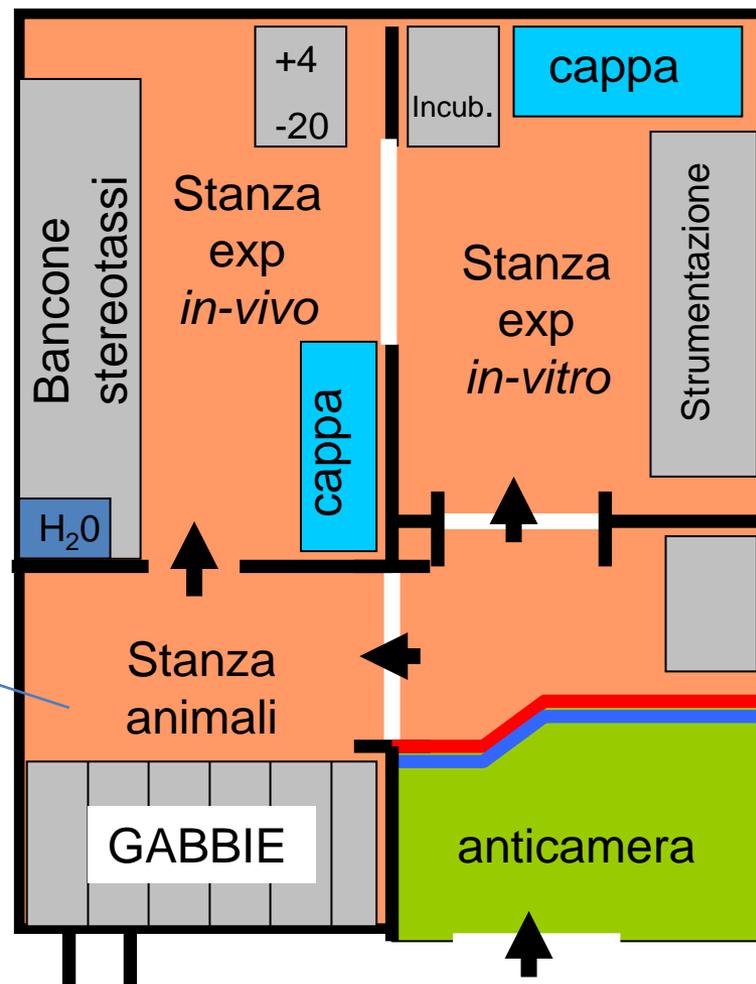
“Procedure in camera di contenimento di livello 2”

Utilizzo di modelli animali

Gli animali vengono confinati nella stanza BSL2 dalla fase di inoculo e per i successivi 7 giorni di stabulazione, con 2 cambi gabbia



Esempio



L'ingresso degli animali nella stanza deve essere riportato nell'apposito registro delle operazioni all'ingresso

Utilizzo di modelli animali

Istallazione: 36 gabbie con ventilazione autonoma controllata elettronicamente



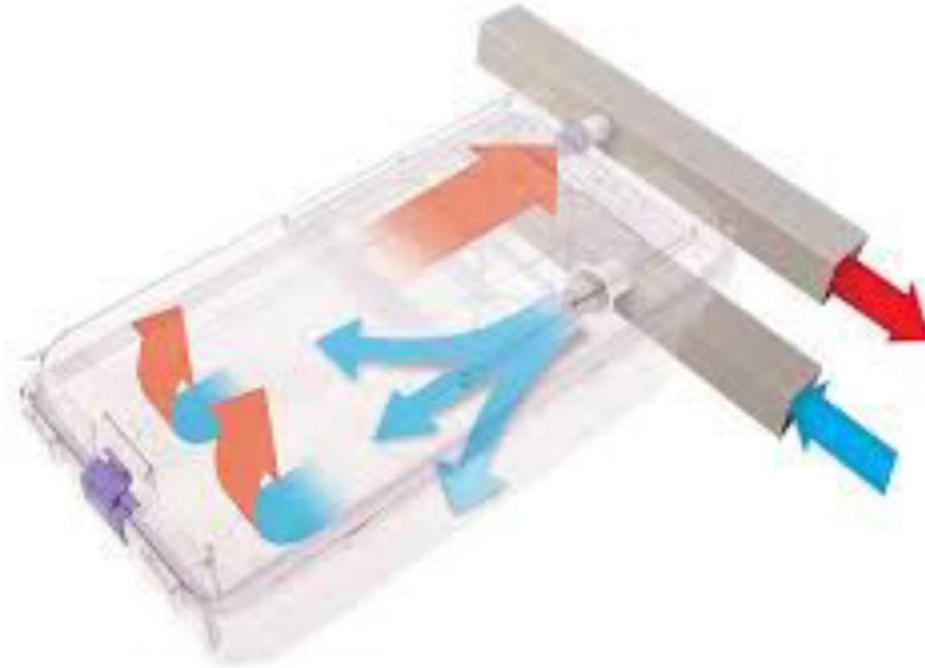
L'illuminazione della stanza è regolata con un ciclo luce/buio dello stesso tipo dello stabulario generale della FSL (Ricorda: spegnere le luci in tutte le stanze prima di uscire per evitare stress agli animali)

Cambio lettiera, cibo e acqua devono essere gestiti dal singolo utilizzatore

IVC : Individually Ventilated Cages



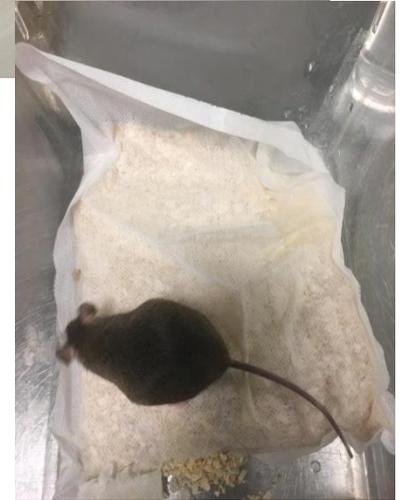
IVC : Individually Ventilated Cages



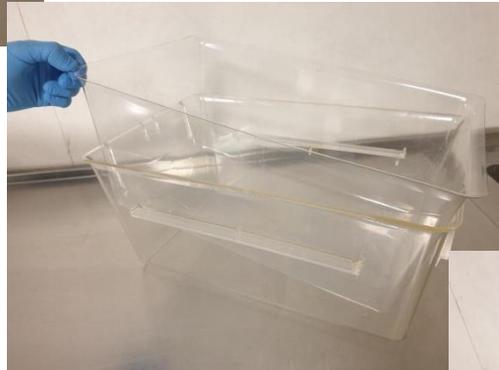
✓ Ventilazione singola

Poca ventilazione: accumulo di ammoniaca, anossia

Eccessiva ventilazione: disturbo degli animali, ipotermia, stress



Stabulazione e benessere animale

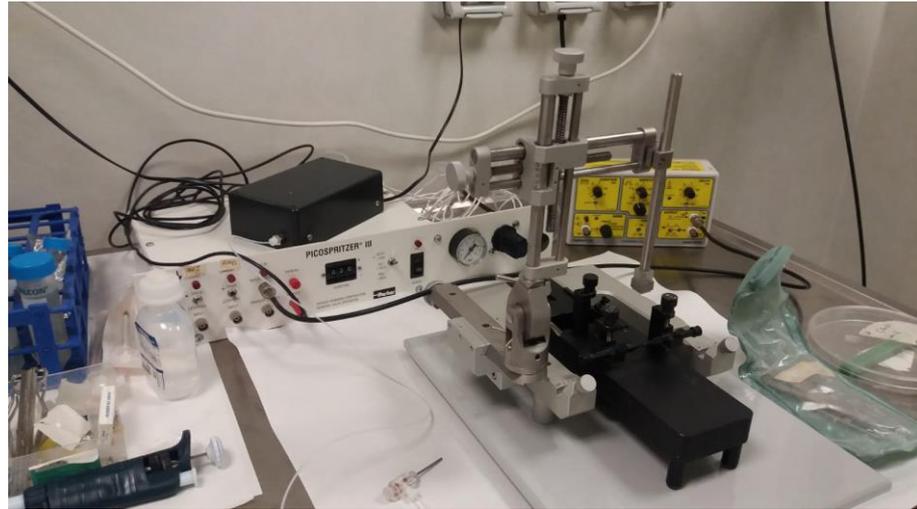


Utilizzo di modelli animali

Attrezzatura disponibile



Postazione per chirurgia stereotassica:



- Apparato stereotassico per Topo e Ratto, con manipolatori e griglie millimetriche per coordinate di iniezione
- Ferri chirurgici
- Sistema Picospritzer ad aria compressa per iniezione controllata di vettori virali
- Stereoscopio con braccio snodato

Utilizzo di modelli animali

Procedure pulizia gabbie:

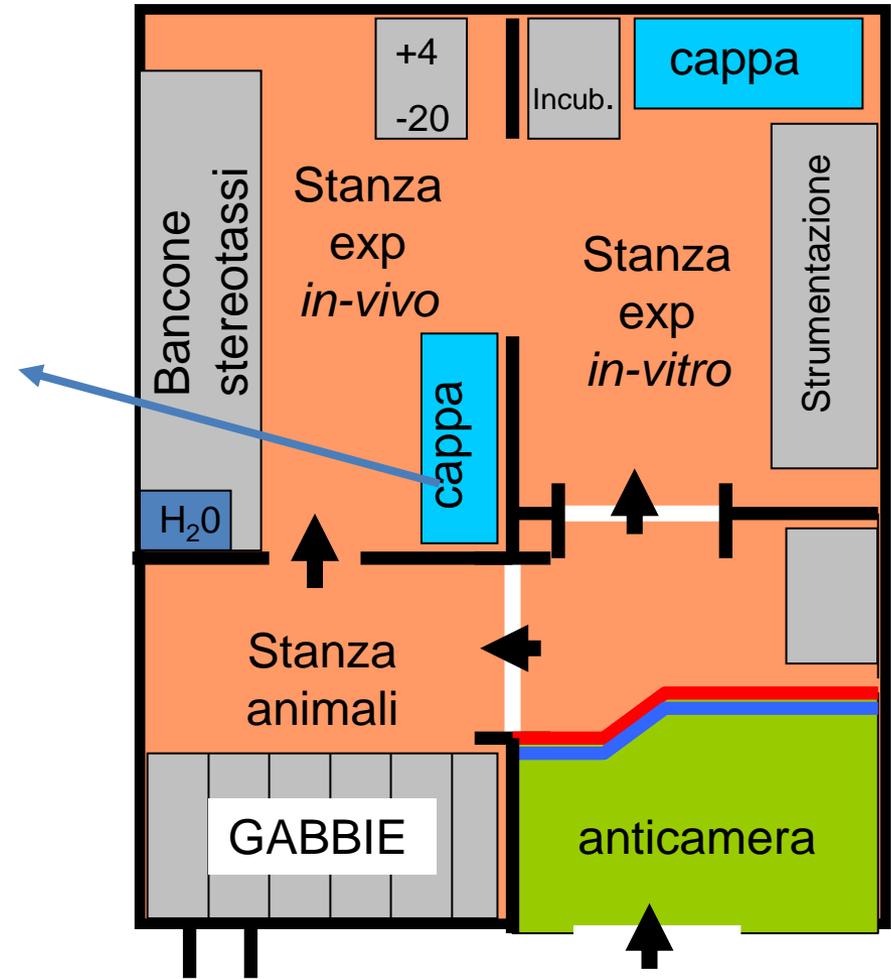
Cambio lettiera, cibo e acqua devono essere gestiti dal singolo utilizzatore



Inoculo e poi 7 giorni di stabulazione

- 4° giorno: cambio gabbia

- 7° giorno: cambio gabbia subito prima di far uscire gli animali dalla BSL2, se necessario



Procedure pulizia gabbie:



Prima di essere inviata al lavaggio, la gabbia (ed ogni sua parte) va spruzzata abbondantemente e lasciata per almeno una notte con VIRKON, all'interno della stanza BSL2, .

Si procede quindi alla rimozione dei residui di lettiera dalla gabbia (smaltiti nei contenitori per rifiuti speciali).

Le gabbie vanno poi spruzzate di nuovo con VIRKON e lasciate per una ulteriore notte.

Le gabbie devono essere poi impilate e inserite nei sacchi neri di plastica. Il sacco va ulteriormente spruzzato con VIRKON.

A questo punto le gabbie imballate possono essere portate fuori dalla stanza BSL2 e consegnate al servizio stabulario per il lavaggio finale.

-Tutti gli strumenti utilizzati e venuti a contatto con MOGM o tessuti dell'animale vanno immersi in ipoclorito di sodio per almeno 30'

Gli strumenti riutilizzabili (bisturi, pinze etc) vanno autoclavati usando le apposite buste

Gli strumenti usa e getta o altro materiale non riutilizzabile vanno smaltiti negli appositi contenitori

I rifiuti sanitari a rischio infettivo devono essere raccolti in appositi imballaggi a perdere recanti la scritta "Rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo" e il simbolo del rischio biologico



Nel caso possano essere presenti materiali taglienti (es. siringhe, lame, ...) devono essere utilizzati imballaggi rigidi a perdere, resistenti alla puntura, recanti la scritta "Rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo"



Quando si opera con prodotti ad alto rischio è opportuno prendere alcune precauzioni:

- Indossare un doppio paio di guanti, il primo paio di guanti deve essere al di sotto del polsino del camice, il secondo paio deve essere al di sopra
- Rimuovere sempre il paio di guanti esterni ed eliminarli ogni volta che si tolgono le mani dal piano di lavoro o si verifica uno spargimento o contatto con materiale pericoloso



Attenzione!!!

MAI RIMANERE A MANI NUDE

Dopo aver manipolato MOGM o tessuti animali evitare di toccare superfici e altre attrezzature all'interno della stanza (cambiare il secondo guanto)





Normativa
(prescrizioni e raccomandazioni)

Procedure

**Formazione
del personale**

Grazie per l'attenzione... 

“You never change things by fighting the existing reality. To change something, build a new model that makes the existing model obsolete”

Richard Buckminster 'Bucky' Fuller