



UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche
Sezione di Oncologia e Immunologia



ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
U.O.C. Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica

MANUALE DI CONDOTTA PER IL LABORATORIO DI BIOSICUREZZA DI LIVELLO 3 (BL3)

Un laboratorio di biosicurezza di livello 3 (BL3) è progettato e dotato di attrezzature tali da renderlo adeguato al lavoro con microrganismi del gruppo 3, ovvero quelli che presentano elevati rischi per il personale di laboratorio, ma bassi rischi per la comunità. Non possono, in tale laboratorio, essere impiegati microrganismi di classe superiore come indicato dall'allegato XXLVII del DL 81/2008 e successivi aggiornamenti.

L'accesso al laboratorio viene consentito solo al personale che abbia uno specifico programma di operazioni sperimentali e diagnostiche da condurre nell'ambito del Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche Sezione di Oncologia e Immunologia, della UOC IDMO, e della USD Oncologia di base, sperimentale e traslazionale.

Il presente manuale è redatto in base alle linee guida suggerite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), da Centers for Disease Control (CDC) e dall'Istituto Superiore della Sanità (ISS).

L'operatore otterrà l'autorizzazione all'accesso dopo essere stato istruito ad una corretta condotta sperimentale. Per ottenere l'autorizzazione è necessario seguire le seguenti fasi:

1. colloquio con il Responsabile riguardante la condotta da tenersi durante le operazioni sperimentali e visita guidata all'interno del laboratorio;
2. lettura del manuale fornito;
3. breve istruzione pratica basata sia sull'osservazione di procedure sperimentali condotte nel laboratorio da parte di un operatore specializzato sia l'esecuzione diretta delle stesse sotto la supervisione di un operatore autorizzato;
4. valutazione da parte del Responsabile dell'idoneità per l'accesso.

1. Procedure operative standard

In un Laboratorio di Biosicurezza di 3° livello vengono manipolati agenti biologici di gruppo di rischio 3° ed in particolare viene effettuata attività di diagnostica e di ricerca sul virus HIV. Non è permesso condurre operazioni sperimentali con tali agenti al di fuori del laboratorio di biosicurezza e solamente il personale che deve eseguire tali operazioni, basate su un programma di ricerca o diagnostico, ha l'autorizzazione all'accesso. Tutto il personale che accede al Laboratorio di biosicurezza deve essere informato sul potenziale rischio, istruito sulle procedure operative in modo da operare correttamente e deve attenersi rigorosamente alle procedure descritte.

Il personale che accede al laboratorio BL3 deve sempre seguire le pratiche di sicurezza e:

1. conoscere quali sono i prodotti chimici ed i materiali biologici che vengono usati ed i rischi connessi alla loro manipolazione e seguire le procedure di sicurezza per il loro utilizzo;

2. sapere cosa fare nelle diverse situazioni di emergenza;
3. mai sottovalutare i rischi associati ad un laboratorio BL3.

NB : Deve essere comunicato al Responsabile del laboratorio l'eventuale stato di gravidanza che preclude l'attività nei laboratori a rischio biologico (BL2, BL3), a rischio chimico ed uso di radioisotopi. Tale indicazione è valida sia per il personale sia per gli operatori di ditte esterne, ospiti e visitatori.

1A. Procedure d'accesso:

1. deve essere applicata la regola delle "due persone", in base alla quale nessuno nel laboratorio dovrebbe mai lavorare da solo;
2. il segnale di rischio biologico deve essere esposto sulla porta del laboratorio e deve identificare i microorganismi con cui si lavora ed il nome del Responsabile del laboratorio che controlla l'accesso e che ne stabilisce le condizioni, inclusa la vaccinazione qualora disponibile (es. HBV);
3. l'accesso al laboratorio è limitato agli operatori autorizzati che ne conoscono le norme. L'ingresso deve essere mantenuto sempre chiuso;
4. l'entrata e l'uscita si effettuano rigorosamente attraverso il medesimo passaggio definito "zona filtro";
5. gli eventuali ospiti (visitatori occasionali) possono entrare accompagnati da uno dei responsabili e devono attenersi alle procedure di vestizione generali richieste;
6. gli ospiti devono essere informati del potenziale rischio che le operazioni eseguite nel laboratorio presentano e non possono entrare mentre sono in corso delle operazioni sperimentali;
7. l'accesso è vietato a persone che non abbiano compiuto i 18 anni;
8. tutte le porte dei laboratori, anche quelle interne, devono essere tenute chiuse durante il lavoro;
9. corridoi e porte d'uscita di emergenza devono essere tenute libere da attrezzature e da materiale di consumo e mai occupate anche temporaneamente.

1B. Procedure di protezione personale

Il materiale di vestizione ha lo scopo di provvedere protezione contro contaminazioni da parte di materiale infettivo; tale tipo di vestizione non offre protezione contro potenziale infezione da aerosol.

La vestizione con gli adeguati dispositivi di protezione individuale (DPI) avviene nell'anticamera situata subito dopo la prima porta d'accesso.

Per l'ingresso al laboratorio BL3 è necessario indossare camice monouso, sovracamice (sterile tipo rinforzato) con allacciamento posteriore e polsi elasticizzati, copriscarpe, due paia di guanti (usare preferibilmente guanti di vinile a contatto con la pelle) da indossare sopra i polsini dei camici. Il sovracamice può essere riutilizzato, se non visibilmente contaminato, e dovrebbe essere contrassegnato con il nome dell'operatore.

La protezione delle membrane mucose si effettua con l'uso di mascherina e di occhiali di protezione o schermo antischizzi.

I capelli devono essere legati e inseriti in un copricapo.

Dopo la vestizione con camice monouso, sovrascarpe, copricapo e un primo paio di guanti si può superare la porta gialla ed accedere al laboratorio dove è necessario indossare il sovracamice, mascherina e occhiali di protezione, ed un secondo paio di guanti con eventuali coprimaniche.

Al termine delle procedure sperimentali e dopo la raccolta del materiale da autoclavare si può procedere a scartare il paio di guanti più esterni ed eventuali coprimaniche all'interno del laboratorio, togliere il copricapo che può essere riutilizzato se non contaminato. I copriscarpe ed il resto del materiale a perdere vanno eliminati all'uscita subito dopo la porta gialla all'interno della zona filtro. Gli operatori sono tenuti ad autoclavare il materiale che è stato usato per la vestizione.

1C. Procedure operative microbiologiche standard

1. è assolutamente vietato mangiare, bere, fumare, manipolare lenti a contatto e applicare cosmetici nel laboratorio;
2. non toccarsi mai il viso durante la manipolazione del materiale biologico;
3. è proibito pipettare con la bocca: utilizzare solo pipettatrici automatiche;
4. le etichette non devono essere inumidite leccandole; non si devono portare oggetti alla bocca;
5. operare in modo da minimizzare la creazione di aerosol;
6. le superfici di lavoro vanno decontaminate all'inizio ed alla fine del lavoro con etanolo al 70% e immediatamente dopo incidenti di versamento di materiale con ipoclorito di sodio al 5% (candeggina commerciale);
7. le maniglie delle porte vanno decontaminate almeno una volta al giorno con etanolo al 70% utilizzando carta (salviette) a perdere;
8. tutto il materiale contaminato deve essere posto in contenitori chiusi, assicurandosi che non perdano, e autoclavato prima dell'eliminazione;
9. tutte le operazioni sperimentali devono essere condotte all'interno di una cappa di biosicurezza o altra struttura a contenimento fisico. Nessuna operazione con materiale infettivo deve essere condotta su banchi aperti;
10. possono essere impiegate solo pompe protette da filtri adatti e con trappola intermedia;
11. è proibito l'uso di pipette di vetro, di vetreria (sono preferibili quelli di plastica a perdere) e di strumenti con punte acuminate (siringhe, forbici, bisturi, pipette Pasteur, etc.), ad eccezione dei casi in cui non possano essere sostituiti da altri strumenti, (es: preparazione dei tessuti). Questi dovranno essere smaltiti negli appositi contenitori per materiale tagliente ed autoclavati;
12. utilizzare contenitori a perfetta tenuta per il trasporto di materiale a rischio biologico;
13. cellule producenti virus, liquidi biologici e colturali contenenti virus devono essere inattivati con ipoclorito di sodio (5%) prima di essere trasportati al di fuori del laboratorio;
14. il personale deve procedere a lavarsi le mani una volta uscito dal laboratorio dopo la rimozione dei guanti. Non si può procedere all'uscita del laboratorio calzando i guanti. Qualsiasi materiale trasportato fuori dal BL3 deve essere appropriatamente decontaminato con etanolo e/o ipoclorito e posto in un contenitore pulito, che non richieda l'uso dei guanti, disposto nel passaggio prima dell'ingresso nella BL3;
15. materiali, strumenti e reagenti e campioni impiegati nel laboratorio possono fuoriuscire solo dopo decontaminazione discussa con il personale responsabile;
16. il laboratorio va tenuto pulito, in ordine e sgombro da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro;
17. tutte le attrezzature devono essere decontaminate prima di interventi di manutenzione o di riparazione.

1D. Tecniche di pipettamento

1. non è permesso pipettare con la bocca, bisogna servirsi di pipettatrici automatiche;
2. evitare di forzare l'espulsione del liquido dalla pipetta ed evitare di far fuoriuscire l'ultima goccia dalla pipetta;
3. quando viene scartato il liquido dalla pipetta, la punta dovrebbe essere il più vicino possibile al punto di scarto o bisognerebbe far fluire il materiale lungo le pareti del contenitore per evitare di generare aerosol causato dalla caduta del liquido;
4. i liquidi non andrebbero mescolati attraverso movimenti alternati di aspirazione ed eiezione, ma mescolati o agitati con un vortex in un contenitore chiuso non solo col parafilm;
5. le colture non dovrebbero essere aeree facendo formare delle bolle di aria attraverso il mezzo di coltura.

1E. Norme interne alle quali attenersi scrupolosamente

1. ogni **gruppo** afferente al laboratorio BL3 è responsabile dell'approvvigionamento del materiale di consumo (plastica, terreni, Ficoll, FCS, antibiotici, etc.);
2. ogni **operatore** alla fine del lavoro deve mantenere pulite le superfici di lavoro, lasciare le cappe il più possibile libere da materiali e reagenti, chiudere i sacchi da autoclavare e ripristinare il materiale ultimato;
3. non toccare telefoni e maniglie delle porte con i guanti di lavoro;
4. gli ultimi operatori, prima di uscire dal laboratorio, devono controllare che tutte le strumentazioni e le luci siano spente e che incubatori e frigoriferi/freezer siano perfettamente chiusi e funzionanti.

2. Procedure di ingresso ed uscita dal laboratorio

2A. Procedure di ingresso

1. controllare il manometro per assicurarsi che nel laboratorio esista pressione negativa;
2. la prima porta deve rimanere aperta il meno possibile;
3. dopo la vestizione come da punto 1B (procedure di protezione personale) accedere al laboratorio: le porte della zona filtro non possono essere aperte simultaneamente, pertanto controllare la chiusura della porta precedente prima di aprire la successiva;
4. le porte del laboratorio vanno tenute chiuse durante il lavoro.

2B. All'inizio e al termine delle procedure sperimentali

1. controllare che la cappa sia funzionante;
2. la cappa va messa in funzione alla mattina mezz'ora prima dell'inizio del lavoro e spenta alla sera mezz'ora dopo l'attività;
3. pulire la cappa con un disinfettante (etanolo) prima e dopo l'uso: utilizzare ipoclorito per decontaminare;
4. assicurarsi che la griglia di aspirazione non sia bloccata da materiale;
5. tenere poco materiale sotto cappa;
6. il materiale da autoclavare deve essere raccolto nel contenitore per rifiuti speciali;
7. riporre il materiale da conservare appropriatamente;
8. eliminare il paio di guanti esterno nel contenitore per rifiuti speciali ospedalieri.

2C. Procedure d'uscita

1. il sovracamice rinforzato e tutti gli altri DPI devono essere eliminati subito dopo la porta gialla negli appositi contenitori di rifiuti solidi a rischio infettivo.;
2. attraversare la zona filtro;
3. riporre il camice o tuta negli armadi, eliminare i copriscarpe ed il secondo paio di guanti;
4. lavarsi le mani prima di uscire dalla zona filtro.

3. Procedure di decontaminazione e eliminazione del materiale infetto

Gli operatori autorizzati sono responsabili della decontaminazione di tutto il materiale da eliminare. Attenersi scrupolosamente alle seguenti modalità:

3A. I rifiuti solidi devono essere inattivati prima di lasciare il BL3, in particolare:

1. **Fiasche, piastre e provette** devono essere svuotate e chiuse prima di essere conferite nel **sacco giallo** per rifiuti infettivi;
2. Le **pipette sierologiche** devono essere
 - a. trattate con ipoclorito O.N.
 - b. raccolte in **Alibox lunghi** appositi;
3. I **puntali** devono essere conferiti in **Alibox piccoli**;
4. Poiché tutto il materiale solido utilizzato durante le procedure sperimentali deve essere autoclavato prima di essere fatto uscire dal BL3 ed eliminato, i sacchi gialli e gli alibox devono essere inseriti in **sacchetti biohazard per autoclave**. Questi sacchetti devono essere
 - a. riempiti per metà (in presenza di un'elevata quantità di plastiche) o al massimo per i 2/3 del volume
 - b. chiusi con il nastro adesivo indicatore non troppo stretti
 - c. posizionati all'interno dell'autoclave passante tra BL3 e locale cucina-lavavetreria
5. Il compito del conferimento in autoclave dei rifiuti solidi viene assegnato settimanalmente ad un operatore che deve seguire esattamente le istruzioni per l'apertura, il carico e la chiusura dell'autoclave riportate sull'autoclave stessa dal lato BL3
6. L'autoclave passante è attivata da personale addetto esterno al BL3, che al termine del ciclo di sterilizzazione ripone i sacchetti autoclavati in cartonplast, li compila (data e lab) e li conferisce normalmente nel corridoio.

3B. Tutti i rifiuti liquidi prodotti durante le fasi di processazione dei campioni biologici (inclusi i rifiuti macroscopicamente ematici) o derivati dalle procedure di decontaminazione o residui in provette contenenti campioni biologici

1. non devono essere **mai travasati**
2. devono essere conferiti **ben chiusi nel loro contenitore di produzione all'interno del bidone rigido a doppio involucro nero** con coperchio a pressione contrassegnato con **etichetta "Rifiuti speciali sanitari a rischio infettivo (C.E.R. 18.01.03*)"** **specificando** sull'etichetta bianca che è un rifiuto liquido scrivendo **"04 liquido"**. Quest'ultimo
 - **non deve pesare più di 8-9 Kg**
 - **deve essere pulito esternamente con etanolo al 70%**
 - **deve essere compilato (data e lab)**
 - **e infine posizionato al di fuori del laboratorio BL3** per essere movimentato dalla Ditta Specializzata.
3. Le **soluzioni contenenti ipoclorito** e usate per inattivare le pipette sierologiche, devono essere raccolte con un imbuto (al termine del loro utilizzo) all'interno di taniche apposite posizionate temporaneamente nel lavandino. Una volta riempita, la tanica dovrà essere conferita sempre **all'interno del bidone rigido a doppio involucro nero** con coperchio a pressione contrassegnato con **etichetta "Rifiuti speciali sanitari a rischio infettivo (C.E.R. 18.01.03*)"** **specificando** sull'etichetta bianca che è un rifiuto liquido scrivendo **"04 liquido"**.

3C. Procedure di decontaminazione

Le procedure di decontaminazione si differenziano sulla base degli agenti patogeni utilizzati e del materiale da decontaminare.

1. Per decontaminare le superfici di lavoro da piccoli sversamenti e schizzi accidentali di liquidi contenenti **retrovirus** deve essere usato l'ipoclorito di sodio e successivamente l'alcool al 70%.
2. Per inattivare i microrganismi depositati su strumenti dichiarati autoclavabili, il metodo più efficace e semplice prevede la sterilizzazione con autoclave.
3. Per strumenti danneggiabili dal calore vanno esaminate le procedure specifiche che utilizzano anche la sanitizzazione con perossido di idrogeno.

3D. Conservazione di fiale contenenti materiale infetto

Le fiale di materiale infetto devono essere codificate e sigillate prima di essere conservate nella fase gassosa al di sopra dell'azoto liquido.

Il personale deve indossare protezione per gli occhi e per le mani quando rimuove le fiale dal luogo di conservazione e refrigerazione.

Le superfici esterne delle fiale così conservate devono essere disinfettate quando le si rimuove dal luogo di conservazione.

3E. Trasporto di campioni e di colture

1. i campioni da trasportare all'esterno devono essere in contenitori chiusi, decontaminati ed inseriti in un altro contenitore pulito da poter essere utilizzato senza guanti;
2. le colture cellulari vitali in fiasche o piastre devono essere trasportate in scatole di trasporto impermeabili, infrangibili e chiuse;
3. tutti i campioni, gli stock virali, etc. devono essere trasportati in provette chiuse.

4. Procedure per la corretta utilizzazione degli strumenti

4A. Cappe di biosicurezza

Tutte le procedure sperimentali durante le quali siano presenti agenti infettivi devono essere condotte in cappe di biosicurezza. Alcune procedure, come operazioni di pipettamento, di trasferimento, di mescolamento, di centrifugazione, di sonicazione e di agitazione, generano rilevante quantità di aerosol ed è pertanto necessario avere l'accortezza di eseguire tali operazioni mantenendosi distanti dalla parte della cappa che è aperta verso l'operatore. Ricordare che una cappa di biosicurezza fornisce un efficace contenimento solo quando vengono applicate corrette tecniche microbiologiche. I seguenti suggerimenti sono utili nel contenimento di microorganismi:

1. mantenere la griglia anteriore libera; se il flusso d'aria attraverso la griglia viene bloccato non si otterrà la massima protezione dalla cappa;
2. le cappe non devono essere occupate da oggetti non necessari;
3. quando si maneggiano agenti infettivi devono essere usati due paia di guanti. I guanti esterni vanno rimossi quando sono terminate le manipolazioni sotto la cappa;
4. i materiali che vengono riutilizzati senza essere autoclavati (contenitori, provette e piccoli strumenti devono essere puliti con disinfettanti alcool/ipoclorito prima di essere rimossi dalla cappa);
5. non sono permessi fornelli Bunsen all'interno delle cappe;
6. è essenziale una rigorosa pulizia della cappa prima e dopo l'uso; è inoltre buona regola lasciare la cappa priva di materiale da eliminare e pronta per il successivo operatore;
7. è necessaria una manutenzione periodica della cappa con sostituzione dei filtri e registrazione della funzionalità;
8. è obbligatorio tenere sotto cappa un contenitore per rifiuti liquidi con candeggina, un contenitore per puntali usati che deve essere smaltito in piccoli sacchetti di plastica prima di essere sterilizzato in autoclave;
9. i filtri delle cappe di biosicurezza devono essere sostituiti annualmente assieme ai filtri dell'impianto di aereazione previa sanitizzazione dei locali e delle cappe con perossido di idrogeno.

4B. Procedure di centrifugazione

Centrifugazione a basso numero di giri

Durante le operazioni di carico e scarico delle centrifughe indossare sempre i guanti.

Tutte le centrifugazioni a bassa velocità vanno eseguite in provette chiuse con tappi non con "parafilm" poste negli appositi secchielli da centrifugazione muniti di coperchi o in rotori dotati di guarnizioni. Tali contenitori vanno usati perché, qualora avvenga la rottura di una provetta, il materiale infettivo verrà contenuto nel secchiello e questo potrà successivamente essere aperto e decontaminato sotto la cappa evitando in tal modo la contaminazione di tutta la centrifuga:

Per la centrifugazione attenersi ai seguenti criteri:

1. prima di centrifugare ispezionare i tubi per la presenza di rotture o fessure;
2. assicurarsi che il tipo corretto di adattatore per le provette in uso sia inserito nel secchiello;
3. riempire e decantare tutte le provette e le bottiglie sotto la cappa. Pulire l'esterno delle provette con il disinfettante prima di porle nel rotore;
4. non riempire mai le provette fino all'orlo perché si ha inevitabilmente perdita di liquido attraverso il tappo. Chiudere i tappi delle provette prima della centrifugazione;
5. per decontaminare un rotore o un secchiello, immergere il rotore in etanolo 70% o ipoclorito di sodio al 5% per 20 minuti se non corrosivo per il materiale, far seguire un'immersione in un detergente leggero e quindi risciacquare.

Uso delle microcentrifughe

Le microcentrifughe che possiedono caratteristiche di contenimento, con doppio coperchio, possono essere impiegate al di fuori della cappa di biosicurezza, dopo essersi assicurati che la guarnizione sia presente nel coperchio del rotore e sia intatta. Gli altri modelli di microcentrifughe vanno utilizzati sotto cappe di biosicurezza.

Uso di ultracentrifughe

Gli operatori che intendono utilizzare l'ultracentrifuga devono controllare tutte le istruzioni operative, bilanciare esattamente le provette prima di inserirle nel rotore, inserire e togliere le provette dagli adattatori sotto cappa di biosicurezza.

4C. Procedure di decontaminazione delle centrifughe

Gli adattatori per i tubi, i secchielli ed i rotori vengono considerati contaminati.

Per decontaminare secchielli e rotori riempirli con etanolo al 70% e lasciar agire per 20 minuti, quindi pulire l'esterno spruzzando sempre etanolo al 70% e asciugando con la carta. In caso di rottura di provette o di fuoriuscita di liquidi biologici all'interno della centrifuga:

1. disinfettare mediante l'uso di soluzioni disinfettanti;
2. dopo la disinfezione effettuare la pulizia con uso di guanti protettivi grossi o in alternativa guanti doppi indossando sovracamice e visiera antischizzi;
3. eventuali pezzi di vetreria rotta vanno asportati con molta attenzione e per mezzo di pinze (**i pezzi di vetro vanno smaltiti nei contenitori rigidi per taglienti**).

4D. Uso dei freezer a -20°C e a -80°C

1. tubi, vials e provette vanno conservate in scatole da freezer o in portaprovette chiaramente etichettati, il materiale privo di etichetta dovrebbe essere eliminato previa sterilizzazione;
2. è importantissimo assicurarsi che le porte dei freezers siano chiuse ermeticamente. Gli operatori sono pregati di segnalare tempestivamente qualsiasi malfunzionamento dei freezers;
3. è buona norma pulirli e scongelarli periodicamente e verificarne il buono stato del contenuto ed eliminare i contenitori rotti;
4. durante la pulizia indossare guanti di gomma pesante, sovracamice e visiera antischizzi e utilizzare pinze per asportare frammenti di vetro e plastica e dopo la pulizia procedere alla disinfezione delle superfici del congelatore.

4E. Agitatori magnetici, rotanti, vibranti (vortex)

Prima di utilizzare l'apparecchio per mescolare/agitare un campione verificare che:

1. la velocità di rotazione sia adatta a non provocare schizzi o rotture dei contenitori;
2. il contenitore del campione sia integro e chiuso ermeticamente (non solo col parafilm);
3. in caso sia necessario trattenere con le mani il contenitore o il coperchio assicurarsi di garantire una buona presa;
4. aprire i contenitori sotto cappa attendendo qualche minuto prima di sollevare il coperchio per permettere agli aerosol di depositarsi.

4F. Bagni termostatati

1. installare il bagno termostatato lontano da qualsiasi derivazione elettrica sotto tensione (prese, cavi apparecchi);
2. riempire il bagno termostatato con acqua distillata meglio se con l'aggiunta di un antimuffa o antimicrobico;
3. sostituire l'acqua almeno una volta alla settimana e ogni volta che appare sporca o si contamina trattare come rifiuti infetti. Periodicamente procedere ad una pulizia approfondita e disinfezione del bagno indossando i guanti;
4. evitare di immergere nell'acqua le mani nude.

4G. Omogeneizzatori, sonicatori

L'utilizzo di questi apparecchi può dar luogo a formazioni di schizzi ed aerosol causati da una pressione prodotta all'interno dei contenitori. Per contenere questi rischi occorre:

1. utilizzare apparecchi progettati per l'uso di laboratorio in cappa di sicurezza biologica;

2. riempire ed aprire il contenitore in cappa di sicurezza biologica; attendere circa 10' prima di aprire il contenitore per permettere agli aerosol di depositarsi;
3. verificare sempre prima dell'uso le condizioni dei contenitori e delle chiusure, evitare l'uso di contenitori di vetro, e comunque accertarsi che non siano incrinati;
4. evitare di riempire i contenitori oltre misura;
5. indossare sempre guanti, una protezione per il viso, camice monouso;
6. nel caso di sonicatori l'utilizzatore dovrà indossare anche dispositivi individuali per la protezione dell'udito (tappi, cuffie).

4H. Uso dell'autoclave

L'autoclave passante presente nel laboratorio BL3 viene caricata con materiale contaminato dalla porta situata all'interno del laboratorio, mentre il prelievo del materiale autoclavato per l'eliminazione avviene aprendo l'autoclave dalla stanza adiacente al laboratorio BL3 (zona di sterilizzazione). Consultare le istruzioni operative per l'uso. Il ciclo selezionato deve inattivare completamente il materiale patogeno. Al termine del ciclo assicurarsi di spegnere l'interruttore generale.

5. Incidenti

Deve essere presente nel laboratorio BL3, oltre che per ogni piano dell'edificio, il kit contenente l'occorrente per le operazioni di pulizia in caso di versamenti accidentali :

1. panni assorbenti (almeno 7);
2. pinze;
3. contenitori per taglienti (1);
4. ipoclorito di sodio 5% (candeggina commerciale);
5. guanti grossi da cucina;
6. guanti (vinile/lattice);
7. sovracamice impermeabilizzato;
8. cuffie;
9. occhiali di protezione;
10. mascherina ad alta efficienza FFP3;
11. istruzioni per la pulizia;
12. cartello di divieto d'ingresso per decontaminazione.

5A. Versamento accidentale di materiale infetto

Nel caso di versamento accidentale di materiale infetto seguire le procedure stabilite in modo da minimizzare il rischio di esposizione.

Versamento di piccole quantità di materiale (< 10 ml)

1. coprire il versamento con carta assorbente imbevuta di disinfettante;
2. versare altro disinfettante intorno all'area del versamento. Il materiale versato dovrà rimanere in contatto con il disinfettante per almeno 20 minuti;
3. autoclavare tutta la carta usata, i guanti ed altro materiale utilizzato per pulire il versamento.

Versamento di grosse quantità di materiale (>10 ml)

1. per evitare di inalare aerosol, lasciare la stanza. Avvertire dell'incidente le altre persone presenti ed il responsabile del laboratorio e chiudere la porta;
2. soccorrere il personale esposto: rimuovere gli indumenti contaminati, ed eliminarli. Lavare la cute se esposta con del sapone e poi un antisettico. In caso di schizzi nell'occhio procedere al lavaggio degli occhi presso l'apposita doccia per 15 minuti. E' disponibile inoltre anche doccia completa;
3. la persona eventualmente contaminata deve attivare la procedura prevista per incidenti occupazionali rivolgendosi al Servizio di Malattie Infettive.

Procedure di pulizia

1. apporre un'indicazione che avverta di non entrare e lasciare che l'eventuale aerosol si depositi per 30 minuti;
2. indossare sempre indumenti protettivi (camici rinforzati, guanti, sovrascarpe, cuffie e mascherine FFP3) e raccogliere il materiale per procedere alla decontaminazione (guanti spessi, disinfettante, panni assorbenti, sacchetti biohazard, pinze);
3. versare ipoclorito di sodio sulla carta e su altre aree che possano essere state raggiunte dagli schizzi di materiale contaminato. Tutto il materiale accidentalmente versato deve rimanere in contatto con il disinfettante per almeno 20 minuti;
4. rimuovere il materiale assorbente, pulire 3 volte con panno imbevuto di ipoclorito di sodio procedendo dall'esterno verso il punto di contaminazione e se si tratta di pareti verticali procedere dall'alto al basso. Effettuare l'ultimo passaggio con panno asciutto. Eventuali frammenti vanno rimossi con pinze e riposti in contenitori per taglienti;
5. autoclavare tutto il materiale indossato o usato per pulire il versamento.

5B. Versamento di materiale all'interno di cappe di biosicurezza

1. mantenere la cappa in funzione;
2. spruzzare o pulire con della carta imbevuta di disinfettante le pareti, le superfici e gli strumenti;
3. coprire la superficie di lavoro con disinfettante e lasciar agire almeno 20 minuti; rimuovere il disinfettante con una spugna o con carta assorbente. Togliere le griglie e pulirle con della carta imbevuta di disinfettante; procedere quindi alla pulizia del fondo della cappa;
4. autoclavare tutto il materiale usato per la pulizia.

6. Pulizia e sanificazione degli ambienti

1. le attività di pulizia e sanificazione dei pavimenti devono avvenire dopo che il personale di laboratorio abbia eliminato eventuali rischi specifici presenti;
2. accedere all'area protetta solamente indossando dispositivi di protezione individuali - DPI (sovracamice su divisa con pantaloni, guanti sovrascarpe, cuffia);
3. seguire il percorso attraverso l'area filtro;
4. effettuare le pulizie dei pavimenti solo ad umido ogni giorno; ed almeno 3 volte alla settimana l'ultimo passaggio deve essere eseguito con panno imbevuto con soluzione di cloro all'1% (ipoclorito commerciale diluito 1:5);
5. non manipolare alcuna attrezzatura senza l'autorizzazione o la supervisione degli addetti;
6. in caso di qualsiasi incidente avvertire immediatamente il Responsabile del laboratorio ed il proprio Responsabile;
7. non cercare di rimediare autonomamente agli eventuali incidenti che si possono verificare durante il servizio e seguire scrupolosamente le istruzioni del personale di laboratorio;
8. lasciare il laboratorio solo attraverso i percorsi indicati eliminando i DPI negli appositi contenitori prima di uscire dalla zona protetta;
9. gli attrezzi per la sanificazione usati nell'area protetta non dovranno essere portati fuori di essa e il panno umido usato per le pulizie deve essere autoclavato ed eliminato ogni volta;
10. deve essere inoltre comunicato al proprio Responsabile l'eventuale stato di gravidanza che preclude l'attività nei laboratori a rischio biologico (BL2, BL3), a rischio chimico e uso di radioisotopi.

7. Protocolli di emergenza

1. in caso di versamenti accidentali di piccole o grandi quantità di materiale infetto seguire le procedure indicate nei paragrafi sopra riportati
2. in caso di esposizione accidentale al virus HIV e Microorganismi Geneticamente Modificati (MOGM) lavare immediatamente la parte interessata con acqua se mucosa con etanolo al 70% se cute. Contattare il medico di Malattie Infettive (tel 049/2813765) ed segnalare immediatamente l'incidente al Responsabile della Biosicurezza (tel 049/8215894).
3. in caso di blackout elettrico, che potrebbe non garantire il mantenimento della pressione negativa, uscire immediatamente dal laboratorio utilizzando le chiavi situate vicino alle porte interbloccanti;
4. in caso di incendio seguire le sottoindicate indicazioni:

- comunicare alla sala operativa l'allarme indicando precisamente:
 - a) luogo dell'incendio (reparto, piano, edificio)
 - b) nome e cognome di chi chiama ed in numero di telefono da cui chiama

- comunicare al personale dipendente di reparto di mettersi a disposizione per la gestione dell'emergenza attenendosi a quanto loro disposto;
- far uscire dalle uscite di sicurezza il personale non coinvolto nell'emergenza (studenti, tirocinanti, pubblico) indirizzandolo verso il luogo sicuro esterno di raccolta;
- attendere l'arrivo degli operatori tecnici della squadra di pronto intervento indirizzandoli sul luogo dell'incendio ed informarli delle procedure da adottare per l'ingresso nel laboratorio BL3 ed aiutarli nella vestizione dei D.P.I.;
- portare fuori dal laboratorio e prestare soccorso all'infortunato/i da parte della squadra di pronto intervento;
- attendere l'arrivo degli operatori sanitari della squadra di pronta evacuazione per il salvataggio dell'infortunato/i;
- mettersi a disposizione dei Vigili del Fuoco
- mettersi a disposizione del Coordinatore del P.E (Piano di Emergenza)
- mettersi a disposizione del Referente del Laboratorio

(Il piano dettagliato in caso di incendio è stato redatto da R. Cesarotto – Servizio Prevenzione Protezione, Azienda Ospedaliera Padova, dopo simulazione di incendio effettuata nel Maggio 2003)

(Documento aggiornato il 20 dicembre 2021. Responsabile : Prof.ssa Anita De Rossi)