

ALL. A

# DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

## “VIRUS FACILITY”

### PROCEDURE OPERATIVE STANDARD (POS)

#### 1-Introduzione

Questo laboratorio (identificato come: ed. **R-RA -st. 111-VF** – Mappatura UNITS: **AR01 PT A 017**) è autorizzato dal Ministero della Salute come *“impianto per l'impiego confinato di MOGM”*; il livello di biosicurezza applicato è definito come BSL2 e sono dunque ammessi solo progetti sperimentali autorizzati dal Ministero della Salute aventi livello di sicurezza massimo corrispondente al **BSL 2**.

Il laboratorio è dedicato alla manipolazione dei VETTORI DERIVATI DA VIRUS e vi possono essere eseguite tutte le procedure riguardanti la loro manipolazione, tra cui confezionamento e trasduzione.

Circa i vettori lentivirali, sono ammessi solo quelli di II generazione e superiori.

#### 2- Accesso del personale

##### 2.1 Procedura per accedere al laboratorio

L'Utilizzatore autorizzato deve inviare una RICHIESTA DI ACCESSO (all.2) al Direttore del Dipartimento ed al preposto del laboratorio per chiedere l'accesso di un ricercatore appartenente al gruppo.

La richiesta deve indicare il progetto autorizzato su cui lavorerà il ricercatore.

L'Utilizzatore autorizzato si impegna a mantenere il numero degli operatori il più esiguo possibile per garantire una buona formazione e addestramento.

Prima dell'inizio dell'attività il ricercatore dovrà:

- compilare nuovamente/aggiornare la scheda delle attività previste per la sorveglianza sanitaria (<https://portale.units.it/it/servizi/prevenzione-e-protezione/sorveglianza-sanitaria/personale>) indicando, oltre al rischio biologico, alla voce “altro” la “manipolazione di vettori virali”;
- seguire un corso di formazione teorica sui rischi specifici associati all'impiego di vettori virali;
- seguire un periodo di formazione pratica sotto la supervisione di un ricercatore esperto (Utente autorizzato), di cui dovrà essere tenuto traccia con registrazione della data, contenuti, durata e firma del ricercatore incaricato della formazione.
- L'Utilizzatore autorizzato, sentito il parere del ricercatore esperto, certifica la conclusione del periodo di formazione e chiede l'attivazione dell'accesso alla Facility tramite chiave/badge mettendo in copia il Direttore.

Le POS per le procedure pianificate devono essere scritte e devono essere sempre presenti nel laboratorio.

Tutto il personale che entra nella stanza 111-VF è responsabile di garantire che questa procedura sia seguita correttamente per ridurre al minimo il rischio di contaminazione degli operatori e dei prodotti.

**Gli studenti universitari e i ricercatori di altre istituzioni NON hanno accesso al laboratorio.**

##### 2.2 Prenotazione

La prenotazione della stanza 111-VF è obbligatoria attraverso la piattaforma dedicata presente in PICK (<http://dsvbizet.units.it/~prenotazioni/mrbs/month.php?year=2025&month=02&day=10&area=9>)

I dati relativi all'attività svolta devono essere inseriti nel REGISTRO ATTIVITA' situato nella stanza. È obbligatorio indicare il nome del ricercatore, l'ora di inizio e di fine dell'attività, il tipo di virus, il nome dei vettori utilizzati e firmare per certificare che la stanza di coltura cellulare e tutti gli strumenti utilizzati durante la sperimentazione sono stati utilizzati e puliti secondo le linee guida.

##### 2.3 Orario attività

Per motivi di sicurezza, l'attività nella stanza deve essere svolta nell'usuale orario lavorativo settimanale (lun- ven -- 9.00-17.00); non è consentita nei giorni festivi.

### **3- Prevenzione e Procedure di biosicurezza**

#### **3.1. Strumenti taglienti o pungenti**

Al fine di eliminare il rischio di autoinoculo, nessuna procedura attuata sotto cappa può essere svolta con aghi o altri strumenti taglienti o pungenti come pipette in vetro Pasteur, forbici appuntite, bisturi e lamette da barba.

È vietato anche l'uso di vetreria; utilizzare invece plastica monouso.

Sono ammesse solo forbici per l'apertura di imballaggi fuori cappa.

#### **3.2 Contenimento fisico**

Tutto il lavoro con i vettori virali deve essere eseguito in un laboratorio BSL2 / BSL2+.

L'accesso al laboratorio deve essere limitato durante le attività.

La porta della stanza deve essere sempre tenuta chiusa per mantenere il contenimento.

I cestelli basculanti delle centrifughe devono essere dotati di coperture di sicurezza a tenuta di aerosol.

#### **3.3 Abbigliamento e Dispositivi di protezione individuali (DPI)**

Nell'area non sono ammessi sandali o scarpe aperte né pantaloni corti/gonne.

Camici da laboratorio monouso dedicati e guanti monouso devono essere indossati sempre, sin dal momento di entrata; è ammesso riutilizzare i camici quando non si sia lavorato con virus infettanti.

È obbligatorio indossare due paia di guanti monouso quando si lavora sotto cappa.

Il paio di guanti esterno deve essere tolto sotto la cappa di biosicurezza ogni volta che si tocca qualcosa all'esterno.

All'uscita dalla stanza, guanti e **camice** devono essere tolti.

In tutte le procedure, anche sotto cappa, in cui si manipolano materiali virali è obbligatorio indossare gli occhiali.

Nel caso di rischio di esposizione a vettori al di fuori della cappa (per formazione di aerosol, sversamenti o altro) devono essere indossati una mascherina FFP2 e occhiali di protezione.

#### **3.4 Sposamento di liquidi / Rifiuti liquidi**

È necessario utilizzare dispositivi di trasferimento liquidi come micropipette con puntali in plastica e propipettatori con pipette da serologia in plastica, dedicati alla stanza. Le operazioni di pipettaggio devono essere effettuate lentamente e delicatamente per evitare sversamenti ed aerosol.

I liquidi contaminati da virioni devono essere trasferiti da un contenitore all'altro solamente sotto cappa usando i dispositivi di plastica detti sopra.

Per i liquidi contaminati è presente un contenitore dei rifiuti liquidi dedicato sotto cappa e dotato di tappo, contenente Udenil (vedi 4.3) preparato in giornata. Tutti i liquidi contenenti virioni devono essere versati tramite pipetta in questo contenitore per il processo di inattivazione chimica. Il giorno seguente (o i successivi) il liquido può essere travasato per sversamento dal contenitore nella tanica.

**NON UTILIZZARE LA POMPA DI ASPIRAZIONE PER ASPIRARE TERRENI E LIQUIDI POTENZIALMENTE CONTENENTI VIRIONI.**

#### **3.5 Inattivazione dei virioni su plastiche / rifiuti solidi**

Le pipette di plastica e i puntali entrati in contatto con particelle virali devono essere risciacquati due volte con UDENIL prima di essere gettati nel contenitore di rifiuti solidi sotto cappa; questi rifiuti sono catalogati come "rifiuti sanitari a rischio infettivo."

Le provette/i tubi contaminati/ le petri devono essere riempiti con Udenil per 1/20 del volume, ritappati e ruotati per bagnare tutte le pareti. Attendere 10' per l'inattivazione, poi sversare l'Udenil nei rifiuti liquidi e inserire l'oggetto nel contenitore di rifiuti solidi sotto cappa.

#### **3.6 Kit per sversamenti**

Il laboratorio deve disporre di un kit per eventuali sversamenti facilmente accessibile. Ciò comprende:

- uno schema di facile lettura della SOP (Standard Operative Procedure) di gestione dello sversamento,
- guanti,
- maschere od occhiali protettivi,
- camice monouso di ricambio,
- asciugamani di carta per assorbire liquidi contaminati,
- disinfettante,

- pinze per raccogliere eventuali frammenti rotti
- sacchetto per materiale a rischio biologico.

#### **4- La cabina (o cappa) di biosicurezza**

##### **4.1 Utilizzo**

La cabina di biosicurezza deve essere igienizzata prima e dopo ogni sessione di lavoro con idonea soluzione sterilizzante seguita da etanolo o isopropanolo al 70%.

Allo spegnimento deve essere effettuato il ciclo UV.

NB: Non usare ipoclorito di sodio (=candeggina) nella cappa perché corrode le superfici interne di acciaio.

La cabina deve funzionare per almeno 5' prima di essere usata per le procedure, in modo da pulire l'area di lavoro.

La cabina deve essere accesa dal primo utente e spenta dall'ultimo utente della stanza; il lavoratore deve quindi attivarsi per conoscere i turni di lavoro nella stanza tramite la piattaforma per la prenotazione.

Non riempire la cappa con oggetti non necessari.

##### **4.2 Gestione rifiuti sotto cappa**

Il primo utente della giornata deve:

- Chiudere il sacchetto con i rifiuti solidi presente sotto cappa, spruzzarlo con etanolo/isopropanolo 70% e gettarlo nell'apposito cartone per i rifiuti sanitari a rischio infettivo.
- Versare i rifiuti liquidi inattivati nella tanica da 10 litri esterna alla cappa.
- Riempire il contenitore dei rifiuti liquidi con nuovo UDENIL.

##### **4.3 PREPARAZIONE DELL'UDENIL**

Diluire un terzo del misurino di UDENIL polvere per 200 ml di acqua di rubinetto (aumentare il dosaggio quando necessario). NB: UDENIL intacca alluminio, rame e ottone.

#### **5- Centrifuga, microscopio, incubatori, pompa aspirante per liquidi.**

##### **5.1 Precauzioni per la centrifugazione**

Le provette/i tubi destinati alla centrifugazione vanno chiusi ed aperti solo sotto cappa. Bilanciare opportunamente i tubi.

Alla fine della centrifugazione, decontaminare rotore, buckets e camera interna della centrifuga con etanolo/isopropanolo 70%.

NB: UDENIL intacca alluminio, rame e ottone, quindi in caso di sversamento e contaminazione utilizzare una soluzione di amuchina/ etanolo/isopropanolo 70% per il rotore.

##### **5.2 Microscopio**

Qualsiasi versamento di liquido sul tavolino del microscopio deve essere prontamente asciugato e, nel caso provenga da colture virali, si deve pulire con etanolo/isopropanolo 70% e gettare il panno nel cartone dei rifiuti sanitari solidi a rischio infettivo.

Concluse le operazioni, passare comunque un panno con etanolo/isopropanolo 70% nell'ordine: sugli oculari, sulle manopole di messa a fuoco e sul tavolino del microscopio.

##### **5.3 Incubatori**

Un incubatore è dedicato alle colture cellulari in assenza di virus identificato dal simbolo (**V-**); l'altro è dedicato alle colture cellulari utilizzate per la produzione di virus infettanti e durante la fase di trasfezione identificato dal simbolo (**V+**).

È prevista una pulizia periodica ogni 3 mesi di utilizzo continuativo, o comunque in caso di fermo attività e spegnimento degli incubatori. La pulizia sarà eseguita sotto la supervisione del preposto. Nel caso di sversamenti di liquidi contenenti virus – infettanti o meno – fare riferimento al punto 11.2.

##### **5.4 Pompa aspirante per liquidi**

La pompa deve essere usata solo per aspirare liquidi NON contenenti materiale virale, in nessuna fase. Vedi punto 3.3.

## 6- Uso del miscelatore a vortice (Vortex).

La Miscelazione con vortex va eseguita esclusivamente con provette chiuse da tappo ermetico ed effettuata sotto cappa, per proteggere dagli aerosol prodotti. Dopo l'agitazione, attendere un minuto per lasciare depositare l'aerosol. L'apertura della provetta deve avvenire quanto più possibile vicino al fondo della cappa, per minimizzare il rischio di fuoriuscita di aerosol in ambiente.

## 7- Gestione di materiale all'esterno della stanza.

### 7.1

I virus impaccati possono essere rimossi dalla stanza solo ai fini della crioconservazione (art. 8) e devono comunque essere utilizzati per l'infezione di cellule bersaglio esclusivamente all'interno della Facility.

### 7.2

I vettori virali in cui è frammentato il genoma originario retro- /lenti- virale NON costituiscono rischio biologico finché i vettori rimangano separati. È consentito il trasporto di tale materiale all'esterno della facility. Come buona pratica, è consigliabile mantenere un'aliquota dei vettori nel proprio laboratorio, da cui amplificare il vettore per le trasfezioni, mantenendo un flusso unidirezionale dal laboratorio alla facility.

### 7.3

Non sono ammesse linee cellulari micoplasma positive, né negativizzate dopo eventuale trattamento micoplasmicida.

### 7.4

La linea cellulare target non trasdotta, proveniente dal laboratorio, deve essere risposta nell'incubatore dedicato V-. La linea trasdotta, nelle 24 ore d'infezione, va riposta nell'incubatore dedicato V+. Una volta eliminato il surnatante infettivo e trascorse quindi 24 ore, le cellule trasdotte possono essere riportate nel proprio laboratorio.

### 7.5

Qualsiasi procedura diversa da quelle descritte di seguito dovrà essere preventivamente approvata.

## 8- Conservazione stock virali

La conservazione degli stock virali va effettuata in contenitori secondari a tenuta stagna (ad esempio contenitori per congelatori) in un congelatore a -80°C chiaramente contrassegnati con un'etichetta di avvertenza per indicare la presenza di virus.

## 9- Rifiuti

### 9.1 Rifiuti solidi

Quando il sacco giallo del contenitore in cartone dei rifiuti sanitari solidi a rischio infettivo è pieno per **2/3 della capacità**, chiuderlo con la fascetta / nastro adesivo; poi chiudere il cartone e posizionarlo nella st. 227, indicando sul coperchio solo il numero del laboratorio (**st. 111-VF**).

NB: i rifiuti solidi sono catalogati con CER 180103\*: Rifiuti che devono essere raccolti e smaltiti applicando precauzioni particolari per evitare infezioni. Si considera tuttavia che le procedure di inattivazione attuate sotto cappa abbiano eliminato totalmente il rischio sanitario.

### 9.2 Rifiuti liquidi

Quando la tanica è piena, chiamare il preposto al laboratorio per la sostituzione.

NB: i rifiuti liquidi, in virtù del trattamento chimico attuato per lo spegnimento dei virioni, sono catalogati con CER 160506\*: Sostanze chimiche di laboratorio contenenti o costituite da sostanze pericolose, comprese le miscele di sostanze chimiche di laboratorio.

### 9.3 Rifiuti provenienti da gestione di sversamenti accidentali di liquidi potenzialmente a rischio (vedi 10.5)

Assorbenti utilizzati per assorbire liquidi, frammenti, altro, trattati con Udenil, vanno inseriti in un sacchetto di plastica che, ben richiuso, andrà messo nel contenitore dei rifiuti solidi.

## 10- Procedure di emergenza

### 10.1 Segnalazione degli incidenti

Tutti gli incidenti, siano essi causa di infortunio o meno, devono essere immediatamente segnalati al preposto che inoltrerà opportuna segnalazione al Direttore del dipartimento, al responsabile del servizio prevenzione e protezione RSPP ed al medico competente. La segnalazione ha lo scopo di migliorare queste procedure e aumentare prevenzione e protezione.

### 10.2 Sversamenti

La gestione dello sversamento è responsabilità della persona che lo ha causato. La superficie contaminata deve essere trattata estensivamente con UDENIL (eccetto per alluminio, rame e ottone, dove si userà solo amuchina o etanolo /isopropanolo al 70%) per almeno 15 minuti utilizzando carta imbevuta. La superficie va poi risciacquata con amuchina o con etanolo /isopropanolo al 70%. La carta, il materiale e i resti della coltura danneggiata devono essere messi in un sacchetto di biosicurezza.

### 10.3 Esposizione accidentale ai vettori virali

Nel caso in cui una parte del corpo, non protetta da guanti, camice od occhiali, venga a contatto con del materiale contaminato da vettori virali, oppure si sia stati esposti ad aerosol, è necessario:

- Seguire la procedura operativa allegata, "flowchart infortunio" (All. 1) esposta nella stanza
- Avvisare tempestivamente e richiedere l'assistenza di:
  - Preposto alla virus facility (dott. Stebel - 331 6990767)
  - Responsabile del Servizio Prevenzione e Protezione (dott. Rismondo – 366 6615880)
  - Medico competente (Prof.ssa Mauro – 0403992452, mmauro@units.it)
- compilare il "**Mod. B - REPORT INFORTUNIO CON VETTORI VIRALI**" disponibile nella stanza e presentarlo alla struttura sanitaria interpellata.
- Comunicare l'infortunio all'Ufficio di Competenza seguendo quanto riportato nella specifica pagina web del Servizio di Prevenzione e Protezione ( <https://portale.units.it/it/servizi/salute-e-sicurezza/sorveglianza-sanitaria/infortuni> )

Le indicazioni standard concernenti un infortunio biologico sono presenti al link: <https://portale.units.it/it/servizi/prevenzione-e-protezione/documentazione>)

### 10.4 Formazione di aerosol potenzialmente pericoloso

Tutto il personale deve lasciare immediatamente il laboratorio. L'accesso alla struttura è interdetto per almeno un'ora per consentire il ricambio dell'aria nel laboratorio.

Avvisare tempestivamente e richiedere l'assistenza di:

- Preposto alla virus facility (dott. Stebel - 331 6990767) -
- Responsabile della Sicurezza (dott. Rismondo – 366 6615880) -
- Medico competente (Prof.ssa Mauro – 0403992452, mmauro@units.it)

### 10.5 Perdite dai cestelli del rotore (vedi 9.3)

Se si sospettano problemi durante la centrifugazione, spegnere la centrifuga e lasciarla chiusa per 30' per evitare l'esposizione all'aerosol. Se si scopre lo sversamento al termine del ciclo, chiudere il coperchio e lasciarlo chiuso per 30'. Per tutte le operazioni successive il personale dovrà indossare guanti anti-taglio **REPERIRE** e utilizzare una pinza per rimuovere i frammenti contaminati dallo strumento. Tubi ed altri accessori rotti devono essere trattati con Udenil per almeno 24 ore e poi eliminati. Le provette non danneggiate devono essere trattate con Udenil per almeno 60 minuti prima dell'apertura.

NB: UDENIL intacca alluminio, rame e ottone, quindi utilizzare una soluzione di amuchina opp. etanolo /isopropanolo al 70% per il rotore.

Modifiche /violazioni del protocollo devono essere segnalate al preposto alla virus facility.

---

Fujimoto GR, Wooley DP, Byers KB, Yang OO, Behrman AJ, Winters TH, Hudson TW.

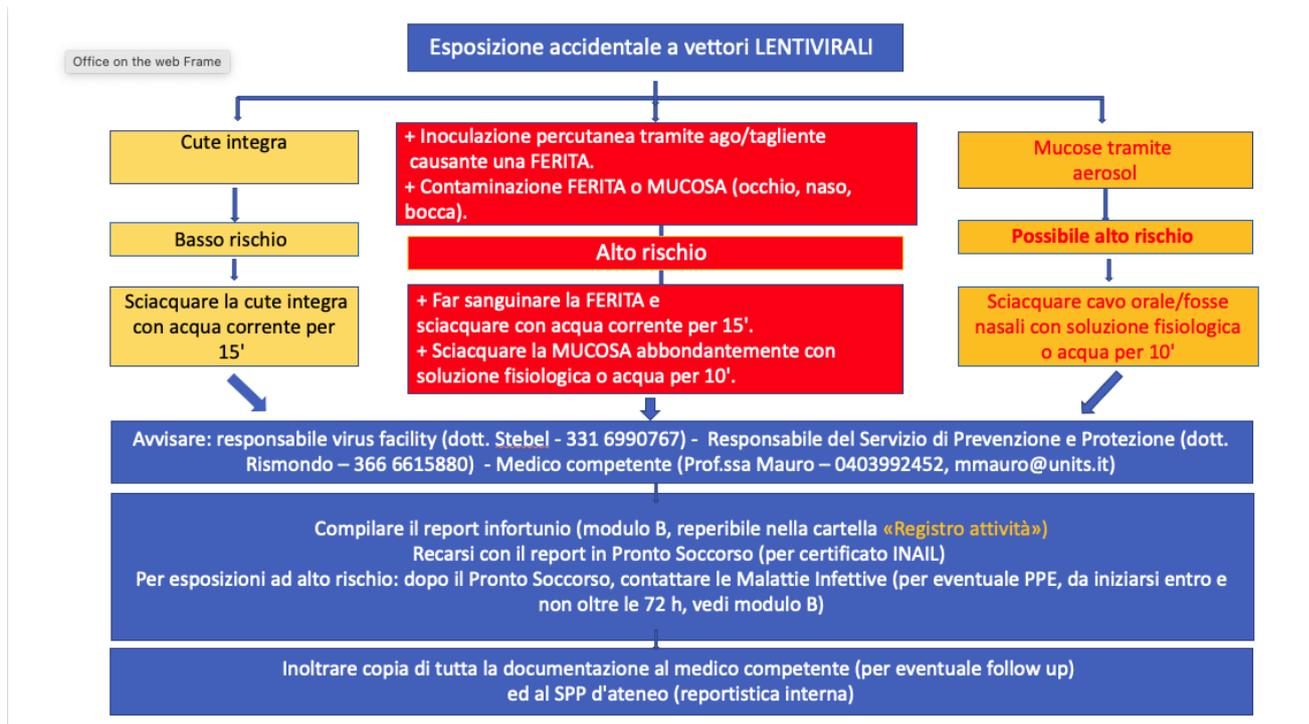
**Update on Managing the Risks of Exposure to Lentiviral and Retroviral Vectors.**

J Occup Environ Med. 2024 Oct 1;66(10):818-825. doi: 10.1097/JOM.0000000000003166. Epub 2024 Jun 11. PMID: 38913827.

<sup>1</sup>Ryan Schlimgen, John Howard, Dawn Wooley, Maureen Thompson, Lindsey R Baden, Otto O Yang, David C Christiani, Gustavo Mostoslavsky, David V Diamond, Elizabeth Gilman Duane, Karen Byers, Thomas Winters, Jeffrey A Gelfand, Gary Fujimoto, T Warner Hudson, Jatin M Vyas

**Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies**

J Occup Environ Med . 2016 Dec;58(12):1159-1166. PMID: 27930472 PMCID: [PMC5152689](#) - DOI:





il vettore è pseudotipizzato?      sì - specifica: \_\_\_\_\_      no

Sono stato esposto a gocce (occhi, naso, bocca) fuori dal contenimento primario?      sì      no

Vaccinazione per epatite B:      sì      no

---

**Per la profilassi post-esposizione<sup>1</sup>: dopo l'accesso e la valutazione in PS contattare l'infettivologo reperibile al 3299504770 per valutazione del caso**

1. Fujimoto GR, Wooley DP, Byers KB, Yang OO, Behrman AJ, Winters TH, Hudson TW. Update on Managing the Risks of Exposure to Lentiviral and Retroviral Vectors. J Occup Environ Med. 2024 Oct 1;66(10):818-825. doi: 10.1097/JOM.0000000000003166. Epub 2024 Jun 11. PMID: 38913827.

## All. 2 - Richiesta di accesso alla virus facility di personale universitario

Al Direttore del DSV

E p.c. Al Preposto alla virus facility

Al medico competente

Al RSPP

SEDE

Gentile direttore,

Con la presente chiedo l'autorizzazione all'accesso alla virus facility del

Dott \_\_\_\_\_

ricercatore afferente al mio gruppo.

A tal riguardo, comunico i seguenti:

- Progetto autorizzato in cui rientra la ricerca: \_\_\_\_\_
- Valutazione sulla sicurezza (estratto del progetto presentato al ministero per ottenere l'aut. Min all'impiego di MOGM): \_\_\_\_\_

L'accesso sarà subordinato a

- Formazione teorico/pratica specifica \*
- Asseverazione dell'idoneità sanitaria comunicata dal medico competente

Il ricercatore si impegna a compilare il Registro attività collocato nel laboratorio ogni volta che utilizzerà la stanza 111-V e ad attenersi alle procedure prescritte.

\* la formazione deve includere uno specifico corso di formazione e un periodo di addestramento.

