



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

# **Manuale per la gestione del rischio biologico in laboratorio**

(aggiornato al 23 maggio 2018)

## INDICE

1. **NORMATIVA DI RIFERIMENTO: D. L.vo 81/08 e smi**
  - 1.1. Allegato xlvi elenco degli agenti biologici classificati
  - 1.2. Adempimenti e misure preventive e protettive
2. **NORME TECNICHE UNI 12128 e UNI 12741: definizione dei livelli di contenimento**
3. **LABORATORI A RISCHIO BIOLOGICO POTENZIALE**
  - 3.1. Colture cellulari
  - 3.2. Laboratori con presenza di campioni biologici di origine animale
    - 3.2.1. Stabulari
    - 3.2.2. Matrici di origine animale e/o vegetale e le allergie
  - 3.3. Laboratori con presenza di campioni biologici di origine umana
4. **DOTAZIONI ED ATTREZZATURE DI LABORATORIO**
  - 4.1. Cappe biologiche
    - 4.1.2. Norma tecnica uni 12469:2001: criteri di prestazione per le postazioni di sicurezza biologica
    - 4.1.3. Esempio di procedura operativa per l'utilizzo della cappa di sicurezza biologica
  - 4.2. Materiali di laboratorio
    - 4.2.1. Contenitori per campioni
    - 4.2.2. Pipette e pipettatori
  - 4.3. Centrifughe
  - 4.4. Freezer e frigoriferi
  - 4.5. Agitatori magnetici, rotanti, vibranti (vortex)
  - 4.6. Bagni termostatici
  - 4.7. Omogeneizzatori, sonicatori
  - 4.8. Le autoclavi
  - 4.9. Incubatori semplici e ad anidride carbonica
  - 4.10. Becchi Bunsen
  - 4.11. Gas compressi e liquefatti
    - 4.11.1. Gas compressi
    - 4.11.2. Liquidi criogenici (Gas liquefatti)
  - 4.12. Strumenti automatici di analisi
5. **DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE (DPI) PER IL RISCHIO BIOLOGICO.**
6. **DECONTAMINAZIONE, DISINFEZIONE O ASEPSI**
  - 6.1. Sterilizzazione e decontaminazione con il calore
  - 6.2. Sterilizzazione e decontaminazione con altri mezzi fisici
  - 6.3. Sterilizzazione e decontaminazione con disinfettanti chimici
  - 6.4. Principali procedure di decontaminazione e disinfezione
    - 6.4.1. Esempi di procedure di emergenza
  - 6.5. Disinfezione (asepsi) della cute e delle mucose
7. **TRASPORTO E SPEDIZIONE DI MATERIALE BIOLOGICI DEPERIBILI E/O POTENZIALMENTE INFETTI (Circolare n. 3 dell'8 maggio 2003)**
8. **IMPIEGO CONFINATO DI MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (MOGM): D. L.vo 206/01 e smi**

**Documenti di interesse**

- Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories (CDC Atlanta, 2012)
- MANUALE OPERATIVO RISCHIO BIOLOGICO (Istituto Superiore di Sanità)
- Criteri di indirizzo per la tutela della salute e sicurezza in tema di valutazione del Rischio Biologico nelle attività istituzionali delle Agenzie per la Protezione dell'Ambiente (Manuali e Linee guida 93/2013, Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, INAIL)
- Rapporti ISTISAN 11/31 – Guida operativa per la manipolazione di materiale a rischio biologico.
- Allergia da animali da laboratorio (LAA) (INAIL, 2016)

## 1. NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Il Titolo X del D. L.vo 81/08 disciplina, in attuazione della direttiva CEE 90/679, l'utilizzo degli agenti biologici nelle attività lavorative, incluse le attività di didattica e di ricerca, prevedendo modalità di lavorazione e misure di sicurezza.

Gli agenti biologici sono classificati in quattro gruppi di rischio:

gruppo 1	presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani;
gruppo 2	può causare malattie in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità, sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
gruppo 3	può causare malattia grave in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può propagarsi nella comunità; di norma esistono efficaci misure profilattiche o terapeutiche;
gruppo 4	può causare malattia grave in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può diffondersi facilmente nella comunità, non sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche.

Negli ambiti in cui è presente un rischio di tipo biologico deve essere apposto il regolare segnale nero su fondo giallo (Allegato XLV, D. L.vo 81/08).



Di seguito si riporta l'Allegato con la classificazione degli agenti biologici.

### 1.1. ALLEGATO XLVI ELENCO DEGLI AGENTI BIOLOGICI CLASSIFICATI

1. Sono inclusi nella classificazione unicamente gli agenti di cui è noto che possono provocare malattie infettive in soggetti umani. I rischi tossico ovvero allergenico eventualmente presenti sono indicati a fianco di ciascun agente in apposita colonna. Non sono stati presi in considerazione gli agenti patogeni di animali e piante di cui è noto che non hanno effetto sull'uomo. In sede di compilazione di questo primo elenco di agenti biologici classificati non si è tenuto conto dei microrganismi geneticamente modificati.

2. La classificazione degli agenti biologici si basa sull'effetto esercitato dagli stessi su lavoratori sani. Essa non tiene conto dei particolari effetti sui lavoratori la cui sensibilità potrebbe essere modificata, da altre cause quali malattia preesistente, uso di medicinali, immunità compromessa, stato di gravidanza o allattamento, fattori dei quali è tenuto conto nella sorveglianza sanitaria di cui all'[articolo 41](#).

3. Gli agenti biologici che non sono stati inclusi nei [gruppi 2, 3, 4](#) dell'elenco non sono implicitamente inseriti nel [gruppo 1](#). Per gli agenti di cui è nota per numerose specie la patogenicità per l'uomo, l'elenco comprende le specie più frequentemente implicate nelle malattie, mentre un riferimento di carattere più generale indica che altre specie appartenenti allo stesso genere possono avere effetti sulla salute dell'uomo. Quando un intero genere è menzionato nell'elenco degli agenti biologici, è implicito che i ceppi e le specie definiti non patogeni sono esclusi dalla classificazione.

4. Quando un ceppo è attenuato o ha perso geni notoriamente virulenti, il contenimento richiesto dalla classificazione del ceppo parentale non è necessariamente applicato a meno che la valutazione del rischio da esso rappresentato sul luogo di lavoro non lo richieda.

5. Tutti i virus che sono già stati isolati nell'uomo e che ancora non figurano nel presente ALLEGATO devono essere considerati come appartenenti almeno al gruppo 2, a meno che sia provato che non possono provocare malattie nell'uomo.

6. Taluni agenti classificati nel gruppo 3 ed indicati con doppio asterisco (\*\*) nell'elenco allegato possono comportare un rischio di infezione limitato perché normalmente non sono veicolati dall'aria. Nel caso di particolari attività comportanti l'utilizzazione dei suddetti agenti, in relazione al tipo di operazione effettuata e dei quantitativi impiegati può risultare sufficiente, per attuare le misure di cui ai punti 2 e 13 dell'ALLEGATO XLVII ed ai punti 2, 3, 5 dell'ALLEGATO XLVIII, assicurare i livelli di contenimento ivi previsti per gli agenti del gruppo 2.

7. Le misure di contenimento che derivano dalla classificazione dei parassiti si applicano unicamente agli stadi del ciclo del parassita che possono essere infettivi per l'uomo.

8. L'elenco contiene indicazioni che individuano gli agenti biologici che possono provocare reazioni allergiche o tossiche, quelli per i quali è disponibile un vaccino efficace e quelli per i quali è opportuno conservare per almeno dieci anni l'elenco dei lavoratori i quali hanno operato in attività con rischio di esposizione a tali agenti.

Tali indicazioni sono:

A: possibili effetti allergici;

D: l'elenco dei lavoratori che hanno operato con detti agenti dove essere conservato per almeno dieci anni dalla cessazione dell'ultima attività comportante rischio di esposizione;

T: produzione di tossine;

V: vaccino efficace disponibile.

<b>BATTERI e organismi simili</b>		
NB: Per gli agenti che figurano nel presente elenco la menzione spp si riferisce alle altre specie riconosciute patogene per l'uomo.		
<b>AGENTE BIOLOGICO</b>	<b>CLASSIFICAZIONE</b>	<b>RILIEVI</b>
Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aggregatibacter Actinomycetemcomitans)	2	
Actinomadura madurae	2	
Actinomadura pelletieri	2	
Actinomyces gerencseriae	2	
Actinomyces israelii	2	
Actinomyces pyogenes	2	
Actinomyces spp	2	
Arcanobacterium haemolyticum (Corynebacterium haemolyticum)	2	
Bacillus anthracis	3	
Bacteroides fragilis	2	
Bartonella bacilliformis	2	
Bartonella (Rochalimea) spp	2	
Bordetella bronchiseptica	2	
Bordetella parapertussis	2	
Bordetella pertussis	2	<u>V</u>
Borrelia burgdorferi	2	
Borrelia duttonii	2	
Borrelia recurrentis	2	
Borrelia spp	2	
Brucella abortus	3	
Brucella canis	3	
Brucella melitensis	3	
Brucella suis	3	
Burkholderia mallei (pseudomonas mallei)	3	
Burkholderia pseudomallei (pseudomonas pseudomallei)	3	

<b>BATTERI e organismi simili</b>		
NB: Per gli agenti che figurano nel presente elenco la menzione spp si riferisce alle altre specie riconosciute patogene per l'uomo.		
Campylobacter fetus	2	
Campylobacter jejuni	2	
Campylobacter spp	2	
Cardiobacterium hominis	2	
Chlamydia pneumoniae	2	
Chlamydia trachomatis	2	
Chlamydia psittaci (ceppi aviari)	3	
Chlamydia psittaci (ceppi non aviari)	2	
Clostridium botulinum	2	<a href="#">I</a>
Clostridium perfringens	2	
Clostridium tetani	2	T, V
Clostridium spp	2	
Corynebacterium diphtheriae	2	T, V
Corynebacterium minutissimum	2	
Corynebacterium pseudotuberculosis	2	
Corynebacterium spp	2	
Coxiella burnetii	3	
Edwardsiella tarda	2	
Ehrlichia sennetsu (Rickettsia sennetsu)	2	
Ehrlichia spp	2	
Eikenella corrodens	2	
Enterobacter aerogenes/cloacae	2	
Enterobacter spp	2	
Enterococcus spp	2	
Erysipelothrix rhusiopathiae	2	
Escherichia coli (ad eccezione dei ceppi non patogeni)	2	
Escherichia coli ceppi verocitotossigenici (es. O157:H7 oppure O103)	<a href="#">3(**)</a>	
Flavobacterium meningosepticum	2	
Fluoribacter bozemanai (Legionella)	2	
Francisella tularensis (Tipo A)	3	
Francisella tularensis (Tipo B)	2	
Fusobacterium necrophorum	2	
Gardnerella vaginalis	2	
Haemophilus ducreyi	2	
Haemophilus Influenzae	2	V
Haemophilus spp	2	
Helicobacter pylori	2	
Klebsiella oxytoca	2	
Klebsiella pneumoniae	2	
Klebsiella spp	2	
Legionella pneumophila	2	
Legionella spp	2	
Leptospira interrogans (tutti i serotipi)	2	
Listeria monocytogenes	2	
Listeria Ivanovii	2	
Morganella morganii	2	
Mycobacterium africanum	3	<a href="#">V</a>
Mycobacterium avium/intracellulare	2	
Mycobacterium bovis (ad eccezione del ceppo BCG)	3	<a href="#">V</a>
Mycobacterium chelonae	2	

<b>BATTERI e organismi simili</b>		
NB: Per gli agenti che figurano nel presente elenco la menzione spp si riferisce alle altre specie riconosciute patogene per l'uomo.		
Mycobacterium fortuitum	2	
Mycobacterium kansasii	2	
Mycobacterium leprae	3	
Mycobacterium malmoense	2	
Mycobacterium marinum	2	
Mycobacterium microti	3(**)	
Mycobacterium paratuberculosis	2	
Mycobacterium scrofulaceum	2	
Mycobacterium simiae	2	
Mycobacterium szulgai	2	
Mycobacterium tuberculosis	3	<u>V</u>
Mycobacterium ulcerans	3(**)	
Mycobacterium xenopi	2	
Mycoplasma pneumoniae	2	
Neisseria gonorrhoeae	2	
Neisseria meningitidis	2	<u>V</u>
Nocardia asteroides	2	
Nocardia brasiliensis	2	
Nocardia farcinica	2	
Nocardia nova	2	
Nocardia otitidiscaviarum	2	
Pasteurella multocida	2	
Pasteurella spp	2	
Peptostreptococcus anaerobius	2	
Plesiomonas shigelloides	2	
Porphyromonas spp	2	
Prevotella spp	2	
Proteus mirabilis	2	
Proteus penneri	2	
Proteus vulgaris	2	
Providencia alcalifaciens	2	
Providencia rettgeri	2	
Providencia spp	2	
Pseudomonas aeruginosa	2	
Rhodococcus equi	2	
Rickettsia akari	3(**)	
Rickettsia canada	3(**)	
Rickettsia conorii	3	
Rickettsia montana	3(**)	
Rickettsia typhi (Rickettsia mooseri)	3	
Rickettsia prowazekii	3	
Rickettsia rickettsii	3	
Rickettsia tsutsugamushi	3	
Rickettsia spp	2	
Rochalimaea quintana	2	
Salmonella arizonae	2	
Salmonella enteritidis	2	
Salmonella typhimurium	2	
Salmonella paratyphi A, B, C	2	<u>V</u>
Salmonella typhi	3(**)	<u>V</u>

<b>BATTERI e organismi simili</b>		
NB: Per gli agenti che figurano nel presente elenco la menzione spp si riferisce alle altre specie riconosciute patogene per l'uomo.		
Salmonella (altre varietà serologiche)	2	
Serpulina spp	2	
Shigella boydii	2	
Shigella dysenteriae (Tipo 1)	<a href="#">3(**)</a>	<a href="#">I</a>
Shigella sonnei	2	
Shigella flexneri	2	
Staphylococcus aureus	2	
Streptobacillus moniliformis	2	
Streptococcus pneumoniae	2	
Streptococcus pyogenes	2	
Streptococcus spp	2	
Streptococcus suis	2	
Treponema carateum	2	
Treponema pallidum	2	
Treponema pertenue	2	
Treponema spp	2	
Vibrio cholerae (incluso El Tor)	2	
Vibrio parahaemolyticus	2	
Vibrio spp	2	
Yersinia enterocolitica	2	
Yersinia pestis	3	<a href="#">V</a>
Yersinia pseudotuberculosis	2	
Yersinia spp	2	
<a href="#">(**) vedi introduzione punto 6</a>		

<b><u>VIRUS (*)</u></b>			
<b>AGENTE BIOLOGICO</b>		<b>CLASSIFICAZIONE</b>	<b>RILIEVI</b>
Adenoviridae		2	
Arenaviridae	LCM-Lassa Virus complex (Arenavirus del Vecchio Mondo)	Virus Lassa	4
		Virus della coriomeningite linfocitaria (ceppi neurotropi)	3
		Virus della coriomeningite linfocitaria (altri ceppi)	2
		Virus Mopeia	2
		Altri LCM-Lassa Virus complex	2
	Virus complex Tacaribe (Arenavirus del Nuovo Mondo)	Virus Guanarito	4
		Virus Junin	4
		Virus Sabia	4
		Virus Machupo	4
		Virus Flexal	3
	Altri Virus del Complesso Tacaribe	2	
Astroviridae		2	

VIRUS (*)				
AGENTE BIOLOGICO		CLASSIFICAZIONE	RILIEVI	
Bunyaviridae	Bhanja	2		
	Virus Bunyamwera	2		
	Germiston	2		
	Virus Oropouche	3		
	Virus dell'encefalite Californiana	2		
	Hantavirus	Hantaan (febbre emorragica coreana)	3	
		Belgrado (noto anche come Dobrava)	3	
		Seoul-Virus	3	
		Sin Nombre (ex Muerto Canyon)	3	
		Puumala-Virus	2	
		Prospect Hill-Virus	2	
		Altri hantavirus	2	
	Nairovirus	Virus della febbre emorragica di Crimea/Congo	4	
		Virus Hazara	2	
	Phlebovirus	Febbre della Valle del Rift	3	<u>V</u>
		Febbre da Flebotomi	3	
		Virus Toscana	2	
Altri bunyavirus noti come patogeni		2		
Caliciviridae	Virus dell'epatite E	<u>3(**)</u>		
	Norwalk-Virus	2		
	Altri Caliciviridae	2		
Coronaviridae		2		
Filoviridae	Virus Ebola	4		
	Virus di Marburg	4		
Flaviviridae	Encefalite d'Australia (Encefalite della Valle Murray)	3		
	Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa centrale	<u>3(**)</u>	<u>V</u>	
	Absettarov	3		
	Hanzalova	3		
	Hypr	3		
	Kumlinge	3		
	Virus della dengue tipi 1-4	3		
	Virus dell'epatite C	<u>3(**)</u>	<u>D</u>	
	Virus dell'epatite G	<u>3(**)</u>	<u>D</u>	
	Encefalite B giapponese	3	<u>V</u>	
	Foresta di Kyasanur	3	<u>V</u>	
	Louping ill	<u>3(**)</u>		
	<u>Omsk (a)</u>	3	<u>V</u>	
	Powassan	3		
	Rocio	3		
	<u>Encefalite inverno-estiva russa (a)</u>	3	<u>V</u>	
Encefalite di St. Louis	3			
Virus Wesselsbron	<u>3(**)</u>			

<b>VIRUS (*)</b>			
<b>AGENTE BIOLOGICO</b>		<b>CLASSIFICAZIONE</b>	<b>RILIEVI</b>
	Virus della Valle del Nilo	3	
	Febbre gialla	3	<u>V</u>
	Altri flavivirus noti per essere patogeni	2	
Hepadnaviridae	Virus dell'epatite B	<u>3(**)</u>	V, D
	<u>Virus dell'epatite D (Delta) (b)</u>	<u>3(**)</u>	V, D
Herpesviridae	Cytomegalovirus	2	
	Virus d'Epstein-Barr	2	
	Herpesvirus simiae (B virus)	3	
	Herpes simplex virus tipi 1 e 2	2	
	Herpesvirus varicella-zoster	2	
	Virus Herpes dell'uomo tipo 7	2	
	Virus Herpes dell'uomo tipo 8	2	<u>D</u>
	Virus linfotropo B dell'uomo (HBLV-HHV6)	2	
Orthomyxoviridae	Virus influenzale tipi A, B e C	2	V (c)
Orthomyxoviridae trasmesse dalle zecche	Virus Dhori e Thogoto	2	
Papovaviridae	Virus BK e JC	2	D (d)
	Papillomavirus dell'uomo	2	D (d)
Paramyxoviridae	Virus del morbillo	2	<u>V</u>
	Virus della parotite	2	<u>V</u>
	Virus della malattia di Newcastle	2	
	Virus parainfluenzali tipi 1-4	2	
	Virus respiratorio sinciziale	2	
Parvoviridae	Parvovirus dell'uomo (B 19)	2	
Picornaviridae	Virus della congiuntivite emorragica (AHC)	2	
	Virus Coxsackie	2	
	Virus Echo	2	
	Virus dell'epatite A (enterovirus dell'uomo tipo 72)	2	<u>V</u>
	Virus della poliomelite	2	<u>V</u>
	Rhinovirus	2	
Poxviridae	<u>Bufalopox virus (e)</u>	2	
	Cowpox virus	2	
	<u>Elephantpox virus (f)</u>	2	
	Virus del nodulo dei mungitori	2	
	Molluscum contagiosum virus	2	
	Monkeypox virus	3	<u>V</u>
	Orf virus	2	
	<u>Rabbitpox virus (g)</u>	2	
	Vaccinia virus	2	
	Variola (major & minor) virus	4	<u>V</u>
	Whitepox virus (variola virus)	4	<u>V</u>
Yatapox virus (Tana & Yaba)	2		
Reoviridae	Coltivirus	2	
	Rotavirus umano	2	
	Orbivirus	2	
	Reovirus	2	
Retroviridae (h)	Virus della sindrome di immunodeficienza umana (AIDS)	<u>3(**)</u>	<u>D</u>
	Virus di leucemie umane e cellule T (HTLV) tipi 1 e 2	<u>3(**)</u>	<u>D</u>

<b>VIRUS (*)</b>				
<b>AGENTE BIOLOGICO</b>		<b>CLASSIFICAZIONE</b>	<b>RILIEVI</b>	
	<a href="#">Virus SIV (h)</a>	<a href="#">3(**)</a>		
Rhabdoviridae	Virus della rabbia	<a href="#">3(**)</a>	<a href="#">V</a>	
	Virus della stomatite vescicolosa	2		
Togaviridae	Alfavirus	Encefalomyelite equina dell'America dell'Est	3	<a href="#">V</a>
		Virus Bebaru	2	
		Virus Chikungunya	<a href="#">3(**)</a>	
		Virus Everglades	<a href="#">3(**)</a>	
		Virus Mayaro	3	
		Virus Mucambo	<a href="#">3(**)</a>	
		Virus Ndumu	3	
		Virus O'nyong-nyong	2	
		Virus del fiume Rosas	2	
		Virus della foresta di Semliki	2	
		Virus Sindbis	2	
		Virus Tonate	<a href="#">3(**)</a>	
		Encefalomyelite equina del Venezuela	3	<a href="#">V</a>
		Encefalomyelite equina dell'America dell'Ovest	3	<a href="#">V</a>
	Altri alfavirus noti	2		
Rubivirus (rubella)	2	<a href="#">V</a>		
Toroviridae		2		
Virus non classificati	Virus dell'epatite non ancora identificati	<a href="#">3(**)</a>	<a href="#">D</a>	
	Morbilivirus equino	4		
<a href="#">Agenti non classici associati con le encefaliti spongiformi trasmissibili (TSE) (i)</a>	Morbidi Creutzfeldt-Jakob	<a href="#">3(**)</a>	D (d)	
	Variante del morbidi Creutzfeldt-Jakob	<a href="#">3(**)</a>	D (d)	
	Encefalite spongiforme bovina (BSE) ed altre TSE degli animali a queste associate	<a href="#">3(**)</a>	D (d)	
	Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker	<a href="#">3(**)</a>	D (d)	
	Kuru	<a href="#">3(**)</a>	D (d)	
<a href="#">(*) Vedi introduzione, punto 5.</a>				
<a href="#">(**) Vedi introduzione, punto 6.</a>				
(a) Tick-borne encephalitis.				
(b) Il virus dell'epatite D esercita il suo potere patogeno nel lavoratore soltanto in caso di infezione simultanea o secondaria rispetto a quella provocata dal virus dell'epatite B. La vaccinazione contro il virus dell'epatite B protegge pertanto i lavoratori non affetti dal virus dell'epatite B contro il virus dell'epatite D (Delta).				
(c) Soltanto per i tipi A e B.				
(d) Raccomandato per i lavori che comportano un contatto diretto con questi agenti.				
(e) Alla rubrica possono essere identificati due virus, un genere "buffalopox" e una variante del virus "vaccinia".				
(f) Variante del "Cowpox".				
(g) Variante di "Vaccinia".				
(h) Non esiste attualmente alcuna prova di infezione dell'uomo provocata da retrovirus di origine scimmiesca. A titolo di precauzione si raccomanda un contenimento di livello 3 per i lavori che comportano un'esposizione a tali retrovirus.				
<a href="#">(i) Non esiste attualmente alcuna prova di infezione dell'uomo provocata dagli agenti responsabili di altre TSE negli animali. Tuttavia a titolo precauzionale, si consiglia di applicare nei laboratori il livello di contenimento 3(**), ad eccezione dei lavori relativi ad un agente identificato di "scrapie" per cui un livello di contenimento 2 è sufficiente.</a>				

PARASSITI		
AGENTE BIOLOGICO	CLASSIFICAZIONE	RILIEVI
Acanthamoeba castellani	2	
Ancylostoma duodenale	2	
Angiostrongylus cantonensis	2	
Angiostrongylus costaricensis	2	
Ascaris lumbricoides	2	A
Ascaris suum	2	A
Babesia divergens	2	
Babesia microti	2	
Balantidium coli	2	
Brugia malayi	2	
Brugia pahangi	2	
Capillaria philippinensis	2	
Capillaria spp	2	
Clonorchis sinensis	2	
Clonorchis viverrini	2	
Cryptosporidium parvum	2	
Cryptosporidium spp	2	
Cyclospora cayetanensis	2	
Dipetalonema streptocerca	2	
Diphyllobothrium latum	2	
Dracunculus medinensis	2	
Echinococcus granulosus	<u>3(**)</u>	
Echinococcus multilocularis	<u>3(**)</u>	
Echinococcus vogeli	<u>3(**)</u>	
Entamoeba histolytica	2	
Fasciola gigantica	2	
Fasciola hepatica	2	
Fasciolopsis buski	2	
Giardia lamblia (Giardia intestinalis)	2	
Hymenolepis diminuta	2	
Hymenolepis nana	2	
Leishmania brasiliensis	<u>3(**)</u>	
Leishmania donovani	3	
Leishmania ethiopica	2	
Leishmania mexicana	2	
Leishmania peruviana	2	
Leishmania tropica	2	
Leishmania major	2	
Leishmania spp	2	
Loa loa	2	
Mansonella ozzardi	2	
Mansonella perstans	2	
Naegleria fowleri	3	
Necator americanus	2	
Onchocerca volvulus	2	
Opisthorchis felinus	2	
Opisthorchis spp	2	
Paragonimus westermani	2	
Plasmodium falciparum	<u>3(**)</u>	

PARASSITI		
AGENTE BIOLOGICO	CLASSIFICAZIONE	RILIEVI
Plasmodium spp (uomo & scimmia)	2	
Sarcocystis sui hominis	2	
Schistosoma haematobium	2	
Schistosoma intercalatum	2	
Schistosoma japonicum	2	
Schistosoma mansoni	2	
Schistosoma mekongi	2	
Strongyloides stercoralis	2	
Strongyloides spp	2	
Taenia saginata	2	
Taenia solium	<a href="#">3(**)</a>	
Toxocara canis	2	
Toxoplasma gondii	2	
Trichinella spiralis	2	
Trichuris trichiura	2	
Trypanosoma brucei brucei	2	
Trypanosoma brucei gambiense	2	
Trypanosoma brucei rhodesiense	<a href="#">3(**)</a>	
Trypanosoma cruzi	3	
Wuchereria bancrofti	2	
<a href="#">(**) Vedi introduzione, punto 6</a>		

FUNGHI		
AGENTE BIOLOGICO	CLASSIFICAZIONE	RILIEVI
Aspergillus fumigatus	2	<a href="#">A</a>
Blastomyces dermatitidis (Ajellomyces dermatitidis)	3	
Candida albicans	2	<a href="#">A</a>
Candida tropicalis	2	
Cladophialophora bantiana (es. Xylchypha bantiana, Cladosporium bantianum o trichoides)	3	
Coccidioides immitis	3	<a href="#">A</a>
Cryptococcus neoformans var. neoformans (Filobasidiella neoformans var. neoformans)	2	<a href="#">A</a>
Cryptococcus neoformans var. gattii (Filobasidiella bacillispora)	2	<a href="#">A</a>
Emmonsia parva var. parva	2	
Emmonsia parva var. crescens	2	
Epidermophyton floccosum	2	<a href="#">A</a>
Fonsecaea compacta	2	
Fonsecaea pedrosoi	2	
Histoplasma capsulatum var. capsulatum (Ajellomyces capsulatus)	3	
Histoplasma capsulatum duboisii	3	
Madurella grisea	2	
Madurella mycetomatis	2	
Microsporum spp	2	<a href="#">A</a>
Neotestudina rosatii	2	
Paracoccidioides brasiliensis	3	
Penicillium marneffeii	2	<a href="#">A</a>
Scedosporium prolificans (inflantum)	2	

FUNGHI		
AGENTE BIOLOGICO	CLASSIFICAZIONE	RILIEVI
Sporothrix schenckii	2	
Sporothrix schenckii	2	
Trichophyton rubrum	2	
Trichophyton spp	2	

## 1.2. ADEMPIMENTI E MISURE PREVENTIVE

L'esercizio da parte del datore di lavoro di attività comportante l'uso deliberato di agenti biologici dei gruppi 2 e 3 implica la **comunicazione** all'organo di vigilanza territorialmente competente, almeno 30 giorni prima dell'inizio dei lavori, delle seguenti informazioni (art. 269):

- a) il nome e l'indirizzo dell'azienda e il suo titolare;
- b) il documento di valutazione del rischio di cui all'art. 271, comma 5;

mentre l'uso di agenti biologici del gruppo 4 è sottoposto all'**autorizzazione preventiva** da parte del Ministero della Sanità (art. 270).

L'art. 271 prevede che il Datore di Lavoro, nell'effettuazione della valutazione dei rischi lavorativi, tenga conto degli aspetti legati all'attività con agenti biologici anche potenzialmente presenti durante l'attività di lavoro.

Gli artt. 272 e 273 prevedono per il datore di lavoro obblighi in relazione all'applicazione di misure tecniche, organizzative, procedurali anche in caso di emergenza (art. 277). Queste indicazioni di tipo generico devono essere meglio dettagliate nel contesto delle procedure operative standard e di sicurezza. Il mancato adempimento alle misure tecniche ed organizzative (sostituzione degli agenti biologici pericolosi con quelli non pericolosi, limitazione nel numero dei potenzialmente esposti, etc.) deve essere oggetto di giustificazione da parte del datore di lavoro.

### Misure tecniche, organizzative, procedurali

Qualora si faccia uso deliberato di agenti biologici classificati o esista un rischio di esposizione potenziale dovranno essere adottate tutte le misure atte ad evitare l'esposizione degli operatori ovvero si dovrà:

- ⇒ evitare l'uso di agenti biologici pericolosi dove possibile
- ⇒ limitare il numero di lavoratori esposti o potenzialmente esposti a rischio
- ⇒ progettare adeguatamente i processi lavorativi
- ⇒ adottare misure di protezione collettiva ovvero misure di protezione individuale qualora non sia possibile evitare altrimenti l'esposizione
- ⇒ adottare misure igieniche per prevenire o ridurre al minimo la propagazione accidentale di un agente biologico all'esterno di un luogo di lavoro
- ⇒ usare il segnale di rischio biologico
- ⇒ elaborare idonee procedure per prelevare, manipolare e trattare campioni di origine umana ed animale
- ⇒ definire procedure di emergenza
- ⇒ verificare la presenza di agenti biologici sul luogo di lavoro al di fuori del contenimento fisico primario, se necessario o tecnicamente realizzabile
- ⇒ predisporre i mezzi necessari per la raccolta, l'immagazzinamento e lo smaltimento dei rifiuti in condizioni di sicurezza, mediante impiego di contenitori adeguati ed identificabili eventualmente dopo idoneo trattamento dei rifiuti stessi
- ⇒ concordare procedure per la manipolazione ed il trasporto in condizioni di sicurezza di agenti biologici all'interno dei luoghi di lavoro.

### Misure igieniche

In tutte le attività in cui si evidenziano rischi per la salute dei lavoratori vanno applicate idonee misure igieniche quali:

- ⇒ mettere a disposizione dei lavoratori servizi sanitari adeguati provvisti di docce con acqua calda e fredda, nonché, se del caso, di lavaggi oculari e antisettici per la pelle
- ⇒ dare in dotazione ai lavoratori indumenti protettivi o altri indumenti idonei, da riporre in posti separati dagli abiti civili
- ⇒ si assicura che i dispositivi di protezione individuale siano controllati, disinfettati e puliti dopo ogni utilizzazione, provvedendo a far riparare o sostituire quelli difettosi prima dell'utilizzazione successiva
- ⇒ si accerta che gli indumenti di lavoro e protettivi che possono essere contaminati da agenti biologici vengano tolti quando il lavoratore lascia la zona di lavoro, conservati separatamente dagli altri indumenti, disinfettati, puliti e, se necessario, distrutti.

Si dovrà imporre il divieto di assumere cibi o bevande e di fumare nelle aree di lavoro in cui c'è rischio di esposizione.

### Misure di emergenza

Fra le misure tecniche, organizzative, procedurali è compresa la stesura di procedura di emergenza atte a fronteggiare eventi accidentali. Tali procedure di gestione interna devono tenere conto di alcuni adempimenti di legge (art. 277, D. L.vo 81/08 e smi) dai quali non si può prescindere ovvero:

- l'obbligo di abbandono della zona interessata da dispersione in ambiente di agenti biologici di classe 2, 3 o 4 da parte dei lavoratori; alla zona contaminata dovrà poi accedere soltanto gli addetti ai necessari interventi equipaggiati di idonei mezzi di protezione.
- Informazione da parte del datore di lavoro agli organi di vigilanza territorialmente competenti, ai lavoratori, ai RLS sull'evento, sulle cause che lo hanno determinato e sulle misure che si intendono adottare, o che già si sono adottate, per porre rimedio alla situazione creata.

Va ricordato anche l'obbligo del lavoratore di segnalare immediatamente al datore di lavoro o al dirigente o al preposto, qualsiasi infortunio o incidente relativo all'uso di agenti biologici.

Per ciascuna situazione lavorativa sono previste **misure specifiche di contenimento** del rischio a vari livelli, secondo quanto previsto dagli allegati XLVII e XLVIII (specifiche per processi industriali).

**ALLEGATO XLVII****SPECIFICHE SULLE MISURE DI CONTENIMENTO E SUI LIVELLI DI CONTENIMENTO**

*Nota preliminare:*

Le misure contenute in [questo ALLEGATO](#) debbono essere applicate in base alla natura delle attività, la valutazione del rischio per i lavoratori e la natura dell'agente biologico di cui trattasi.

A. Misure di contenimento	B. Livelli di contenimento		
	2	3	4
1. La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	No	Raccomandato	Si
2. L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	NO	SI, sull'aria estratta	SI, sull'aria immessa e su quella estratta
3. L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Raccomandato	Si	Si attraverso una camera di compensazione
4. La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	No	Raccomandato	Si
5. Specifiche procedure di disinfezione	Si	Si	Si
6. La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	No	Raccomandato	Si
7. Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Raccomandato	Si	Si
8. Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Si, per il banco di lavoro	Si, per il banco di lavoro e il pavimento	Si, per il banco di lavoro, l'arredo, i muri, il pavimento e il soffitto
9. Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Raccomandato	Si	Si
10. Deposito sicuro per agenti biologici	Si	Si	Si, deposito sicuro
11. Finestra d'ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti	Raccomandato	Raccomandato	Si
12. I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria	No	Raccomandato	Si
13. I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Ove opportuno	Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria	Si
14. Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse degli animali	Raccomandato	Si (disponibile)	Si, sul posto
15. Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Si	Si	Si, con sterilizzazione
16. Trattamento delle acque reflue	No	Facoltativo	Facoltativo

*Richiami all'Allegato XLVII:*

- [Art. 274, co. 3](#) - [Art. 275, co. 1](#) - [Art. 276, co. 1](#) - [ALL. XLVI, punto 6](#)

La valutazione del rischio inoltre deve tener conto delle attività a **rischio biologico potenziale** indicate in maniera generica e non esaustiva nell'allegato XLIV al D. L.vo 81/08.

Così come nell'ambito dell'esposizione ad agenti biologici rientrano anche tutte quelle forme di ipersensibilità, allergie o particolari patologie determinate da prodotti metabolici e/o di scarto che derivano dalla presenza di agenti biologici ovvero particelle di origine biologica (bioaerosol) aerodisperse nell'ambiente di lavoro, causa frequente di sintomi allergici ad altre malattie; il bioaerosol può essere costituito da spore fungine, pollini, batteri, virus, lieviti, alghe, protozoi, frammenti o escrementi di insetti, scaglie di cute o peli di mammiferi, residui o prodotti di organismi come lipopolisaccaridi batterici (endotossine e micotossine).

Gli **artt. 274 - 276** richiedono misure specifiche rispettivamente per i servizi sanitari e veterinari, per laboratori e stabulari e per i processi industriali. *Per le Strutture sanitarie e veterinarie (art. 274) in sede di valutazione dei rischi il datore di lavoro presta particolare attenzione alla presenza di agenti biologici nell'organismo dei pazienti o degli animali e nei relativi campioni e residui ed al rischio che tale presenza comporta in relazione al tipo di attività svolta. Quindi definisce e provvede a che siano applicate procedure che consentono di manipolare, decontaminare ed eliminare senza rischi per l'operatore e per la comunità i materiali ed i rifiuti contaminati. Per i laboratori e stabulari (art. 275) nei quali si potrebbe presentare l'uso di materiali con possibile contaminazione da agenti biologici patogeni per l'uomo e nei locali destinati ad animali da esperimento, possibili portatori di tali agenti, il datore di lavoro adotta misure corrispondenti almeno a quelle del 2° livello di contenimento. Qualora si utilizzino agenti biologici non ancora classificati si applicheranno le misure pari almeno a quelle per il 3° livello.*

L'art. 278 impone l'obbligo della formazione e informazione da parte del datore di lavoro e dei dirigenti comprendente la formalizzazione e la definizione delle modalità temporali secondo le quali tale obbligo viene soddisfatto.

Gli operatori devono ricevere **informazioni** ed **istruzioni** ed essere specificatamente **formati** in particolare per quanto riguarda:

- i rischi per la salute dovuti agli agenti biologici utilizzati
- le precauzioni da prendere per evitare l'esposizione
- le misure igieniche da osservare
- la funzione di indumenti di lavoro e protettivi e dei dispositivi di protezione individuale ed il loro corretto impiego
- le procedure da seguire per la manipolazione di agenti di gruppo 4
- il modo di prevenire il verificarsi di infortuni e le misure da adottare per ridurre al minimo le conseguenze.

L'attività di informazione e di formazione deve essere ripetuta ogni qualvolta venga introdotto un cambiamento nelle attività che influisca sulla natura ed il grado dei rischi.

Sul luogo di lavoro inoltre devono essere apposte in posizione ben visibile cartelli su cui sono riportate le procedure da seguire in caso di infortunio o incidente.

L'art. 279 disciplina le modalità della sorveglianza sanitaria. L'art. 280 prevede che i lavoratori addetti ad attività che comportino l'utilizzo di agenti biologici dei gruppi 3 e/o 4 siano iscritti in apposito Registro degli esposti e degli eventi accidentali (modello e procedura per la compilazione scaricabile alla sezione intranet del Servizio di Prevenzione e Protezione). Mentre l'art. 281 la registrazione dei casi di malattia e di decesso.

Il legislatore ha poi previsto misure specifiche per la **Protezione dalle ferite da taglio e da punta nel settore ospedaliero sanitario (Titolo X bis, D.Lvo 81/08)**. Le disposizioni di questo titolo si applicano (art. 286 bis) a tutti i lavoratori che operano, nei luoghi di lavoro interessati da attività sanitarie (strutture o servizi sanitari del settore pubblico o privato), alle dipendenze di un datore di lavoro, indipendentemente dalla tipologia contrattuale, ivi compresi tirocinanti, apprendisti, lavoratori a tempo determinato, lavoratori somministrati, studenti che seguono corsi di formazione sanitaria ed i sub fornitori (*sub fornitore: ogni persona che operi in attività e servizi direttamente legati all'assistenza ospedaliera e sanitaria nel quadro di rapporti contrattuali di lavoro con il datore di lavoro*).

#### **Misure generali di tutela (art. 286 quater)**

Il datore di lavoro:

- a) assicura che il personale sanitario sia **adeguatamente formato e dotato di risorse idonee** per operare in condizioni di sicurezza tali da evitare il rischio di ferite ed infezioni provocate da dispositivi medici taglienti;
- b) adotta **misure idonee** ad eliminare o contenere al massimo il rischio di ferite ed infezioni sul lavoro attraverso l'elaborazione di una politica globale di prevenzione che tenga conto delle tecnologie più avanzate, dell'organizzazione e delle condizioni di lavoro, dei fattori psicosociali legati all'esercizio della professione e dell'influenza esercitata sui lavoratori dall'ambiente di lavoro;
- c) crea le condizioni tali da favorire la partecipazione attiva dei lavoratori e dei loro rappresentanti all'elaborazione delle politiche globali di prevenzione;
- d) non suppone mai inesistente un rischio, applicando nell'adozione delle misure di prevenzione un ordine di priorità rispondente ai principi generali dell'articolo 6 della direttiva [89/391/CEE](#) e degli articoli 3, 5 e 6 della direttiva [2000/54/CE](#), al fine di eliminare e prevenire i rischi e creare un ambiente di lavoro sicuro, instaurando un'appropriata collaborazione con i rappresentanti dei lavoratori per la sicurezza;
- e) assicura adeguate misure di **sensibilizzazione** attraverso un'azione comune di coinvolgimento dei lavoratori e loro rappresentanti;
- f) **pianifica ed attua iniziative di prevenzione, sensibilizzazione, informazione e formazione e monitoraggio (istituzione di un registro, ndr) per valutare il grado di incidenza delle ferite da taglio o da punta nei luoghi di lavoro interessati;**
- g) promuove la **segnalazione degli infortuni (istituzione di un registro, ndr)**, al fine di evidenziare le cause sistemiche.

All'art. 286 quinquies il legislatore prevede che il datore di lavoro, nella valutazione dei rischi, determini il livello di rischio espositivo a malattie che possono essere contratte in relazione alle modalità lavorative, in maniera da coprire tutte le situazioni di rischio che comportano ferite e contatto con sangue o altro potenziale veicolo di infezione; deve altresì individuare le necessarie misure tecniche, organizzative e procedurali riguardanti le condizioni lavorative, il livello delle qualificazioni professionali, i fattori psicosociali legati al lavoro e l'influenza dei fattori connessi con l'ambiente di lavoro, per eliminare o diminuire i rischi professionali valutati.

L'Art. 286-sexies prevede che, qualora la valutazione dei rischi evidenzia il rischio di ferite da taglio o da punta e di infezione, il datore di lavoro debba adottare **misure di prevenzione specifiche** ovvero misure per prevenire le ferite e la trasmissione di infezioni nel quadro della prestazione di servizi e dello svolgimento delle attività direttamente

connesse all'assistenza ospedaliera e sanitaria, incluso l'impiego di attrezzature ritenute tecnicamente più sicure in relazione ai rischi e ai metodi di smaltimento dei dispositivi medici taglienti, quali i dispositivi medici taglienti dotati di meccanismo di protezione e di sicurezza, in grado di proteggere le mani dell'operatore durante e al termine della procedura per la quale il dispositivo stesso è utilizzato e di assicurare una azione protettiva permanente nelle fasi di raccolta e smaltimento definitivo. Si ricorda che il decreto per dispositivi medici taglienti (art. 286 ter) considera tutti gli oggetti o strumenti necessari all'esercizio di attività specifiche nel quadro dell'assistenza sanitaria, che possono tagliare, pungere o infettare. Gli oggetti taglienti o acuminati sono considerati, ai sensi del presente decreto, attrezzature di lavoro.

#### Misure di prevenzione specifiche

- a) definizione e attuazione di **procedure di utilizzo e di eliminazione in sicurezza** di dispositivi medici taglienti e di rifiuti contaminati con sangue e materiali biologici a rischio, garantendo l'installazione di contenitori debitamente segnalati e tecnicamente sicuri per la manipolazione e lo smaltimento di dispositivi medici taglienti e di materiale da iniezione usa e getta, posti quanto più vicino possibile alle zone in cui sono utilizzati o depositati oggetti taglienti o acuminati; le procedure devono essere periodicamente sottoposte a processo di valutazione per testarne l'efficacia e costituiscono parte integrante dei programmi di informazione e formazione dei lavoratori;
- b) eliminazione dell'uso di oggetti taglienti o acuminati quando tale utilizzo non sia strettamente necessario;
- c) adozione di dispositivi medici dotati di meccanismi di protezione e di sicurezza;
- d) divieto immediato della pratica del reincappucciamento manuale degli aghi in assenza di dispositivi di protezione e sicurezza per le punture;
- e) sorveglianza sanitaria;
- f) effettuazione di **formazione** in ordine a:
  - 1) uso corretto di dispositivi medici taglienti dotati di meccanismi di protezione e sicurezza;
  - 2) procedure da attuare per la notifica, la risposta ed il monitoraggio postesposizione;
  - 3) profilassi da attuare in caso di ferite o punture, sulla base della valutazione della capacità di infettare della fonte di rischio.
- g) **informazione** per mezzo di specifiche attività di sensibilizzazione, anche in collaborazione con le associazioni sindacali di categoria o con i rappresentanti dei lavoratori per la sicurezza, attraverso la diffusione di materiale promozionale riguardante: programmi di sostegno da porre in essere a seguito di infortuni, differenti rischi associati all'esposizione al sangue ed ai liquidi organici e derivanti dall'utilizzazione di dispositivi medici taglienti o acuminati, norme di precauzione da adottare per lavorare in condizioni di sicurezza, corrette procedure di uso e smaltimento dei dispositivi medici utilizzati, importanza, in caso di infortunio, della segnalazione da parte del lavoratore di informazioni pertinenti a completare nel dettaglio le modalità di accadimento, importanza dell'immunizzazione, vantaggi e inconvenienti della vaccinazione o della mancata vaccinazione, sia essa preventiva o in caso di esposizione ad agenti biologici per i quali esistono vaccini efficaci; tali vaccini devono essere dispensati gratuitamente a tutti i lavoratori ed agli studenti che prestano assistenza sanitaria ed attività ad essa correlate nel luogo di lavoro;
- h) previsione delle **procedure** che devono essere adottate **in caso di ferimento** del lavoratore per:
  - 1) prestare cure immediate al ferito, inclusa la profilassi post-esposizione e gli esami medici necessari e, se del caso, l'assistenza psicologica;

2) assicurare la corretta notifica e il successivo monitoraggio per l'individuazione di adeguate misure di prevenzione, da attuare attraverso la registrazione e l'analisi delle cause, delle modalità e circostanze che hanno comportato il verificarsi di infortuni derivanti da punture o ferite e i successivi esiti, garantendo la riservatezza per il lavoratore.

## **2. NORME TECNICHE UNI 12128 e UNI 12741: definizione dei livelli di contenimento**

La definizione dei livelli di contenimento e delle relative misure di prevenzione e protezione è anche argomento di specifiche norme tecniche (**UNI 12128:2000** Livelli di contenimento di laboratori microbiologici, aree di rischio, situazioni e requisiti fisici di sicurezza, **UNI 12471:2001** Linee guida per le operazioni dei laboratori biotecnologici).

Nella UNI 12128:2000 si specificano i requisiti fisici minimi per la sicurezza biologica dei laboratori nei quali avviene la manipolazione di microrganismi che possono presentare un pericolo per la salute umana. Mentre nella UNI 12471:2001 si forniscono le linee guida per le operazioni biotecnologiche abituali nei laboratori di ricerca, sviluppo ed analisi a livello di contenimento 1, 2, 3 e 4. Il fine della norma consiste nel proteggere i lavoratori così come l'ambiente, comprese piante ed animali, dai pericoli biologici.

La **UNI 12128** descrive i requisiti minimi necessari per i vari **livelli base di contenimento fisico**, livelli che vanno da PCL 1 che indica il livello di contenimento più basso a PCL 4 che indica il livello più alto (i requisiti di contenimento di un livello superiore includono quelli dei livelli inferiori). I livelli di contenimento corrispondono alla classe di rischio cui appartiene l'agente biologico che viene utilizzato.

Il livello di contenimento fisico di un laboratorio deve essere chiaramente indicato all'ingresso.

Di seguito si riportano i requisiti minimi richiesti per ogni livello di contenimento; i requisiti basilari (PCL1) sono sempre richiesti; dopodiché, mano a mano che aumenta la pericolosità dell'agente biologico, aumentano le dotazioni richieste nei laboratori.

### **LABORATORIO A CONTENIMENTO FISICO DI LIVELLO 1 (PCL1)**

- Superfici dei banconi resistenti all'acqua, facili da pulire, accessibili alla manutenzione e resistenti ai disinfettanti, detersivi, acidi, sostanze alcaline, solventi ed altre sostanze chimiche di uso comune.
- Laboratorio progettato in modo da facilitarne un'efficace pulizia.
- Presenza di attrezzature per il lavaggio e la disinfezioni delle mani e il lavaggio degli occhi in caso di emergenza.
- Possibilità di riporre temporaneamente gli indumenti di laboratorio (camici).
- Adeguata illuminazione e spazio di lavoro (appendice A della UNI 12128).
- Cabine di sicurezza biologica, se presenti, conformi alla UNI 12469.
- Rifiuti smaltiti in sicurezza (UNI 12740).



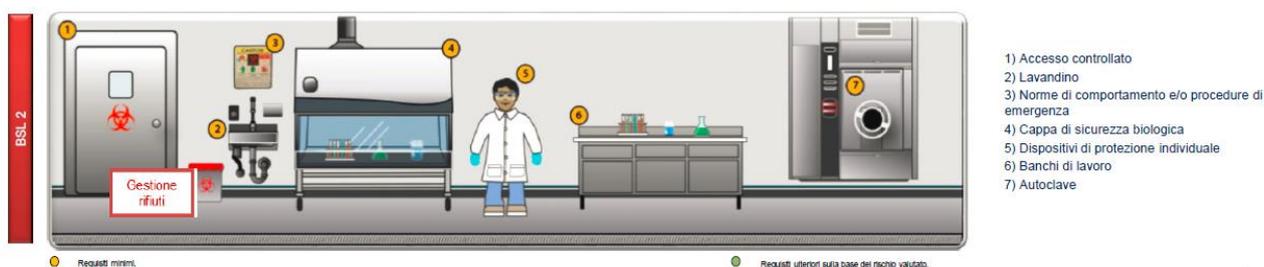
- 1) Accesso controllato
- 2) Lavandino
- 3) Norme di comportamento e/o procedure di emergenza
- 4) Dispositivi di protezione individuale
- 5) Banchi di lavoro
- 6) Autoclave

(immagine tratta da materiale divulgativo INAIL, *Rischio Biologico nei Laboratori*)

### LABORATORIO A CONTENIMENTO FISICO DI LIVELLO 2 (PCL2)

Oltre a quanto richiesto per il PCL 1, viene richiesto:

- Indicazione del rischio biologico sull'esterno del laboratorio
- Laboratorio deve essere separato dalle stanze adiacenti tramite porte e non deve essere una zona di passaggio comune.
- Finestra di osservazione o analogo dispositivo.
- I rubinetti dei lavandini devono essere attivabili senza l'uso delle mani (si consiglia di installare almeno un lavandino vicino alla porta di uscita).
- Pur non essendo richiesta una ventilazione meccanica, se vi fosse deve essere costituita da mandata e ripresa (per evitare ristagni) e senza ricircolo.
- Controllo efficace dei vettori (insetti, roditori, etc.).
- Le cabine di sicurezza biologica potrebbero essere valutate come necessarie per operazioni che possono creare vapori o spruzzi pericolosi.
- Autoclave, se presente, nello stesso edificio del laboratorio.



- 1) Accesso controllato
- 2) Lavandino
- 3) Norme di comportamento e/o procedure di emergenza
- 4) Cappa di sicurezza biologica
- 5) Dispositivi di protezione individuale
- 6) Banchi di lavoro
- 7) Autoclave

1

(immagine tratta da materiale divulgativo INAIL, *Rischio Biologico nei Laboratori*)

### LABORATORIO A CONTENIMENTO FISICO DI LIVELLO 3 (PCL3)

Oltre a quanto richiesto per il PCL 2, viene richiesto:

- Laboratorio distante da zone di passaggio comune e separato dalle stanze adiacenti da porte munite di serratura (eventualmente una zona di equilibrio all'ingresso del laboratorio)
- Superfici dei banconi, pavimenti, muri e soffitti devono essere facili da pulire ed accessibili alla manutenzione.
- Superfici dei banconi e pavimenti resistenti all'acqua, ai disinfettanti, detersivi, acidi, sostanze alcaline, solventi ed altre sostanze chimiche di uso comune.
- Si raccomanda la presenza di salviette usa e getta.
- Presenza di sistemi appropriati di ventilazione tali da mantenere una pressione negativa con sistema di allarme attivato dalle variazioni anomale della pressione ambiente. L'aria estratta dal laboratorio deve essere filtrata

HEPA. Sistemi di mandata e presa dell'aria interbloccati in modo da evitare una sovrappressione accidentale nel laboratorio verso l'esterno.

- Laboratorio e sistema di ventilazione sigillabili per la disinfezione.
- Il laboratorio deve contenere tutta l'attrezzatura necessaria che deve essere di uso esclusivo.
- Presenza di una cabina di sicurezza biologica (UNI 12469).
- Se sono presenti attrezzature critiche che devono poter operare in assenza di elettricità allora deve essere presente un sistema di alimentazione di emergenza.
- Presenza di un sistema di comunicazione fra il laboratorio e l'esterno (p.e. telefono).
- Autoclave nella zona dei laboratori. Si suggerisce autoclave con doppie porte interbloccate con carico nel laboratorio PCL3 e scarico all'esterno.
- Procedura operativa che assicuri che tutti i materiali e le attrezzature siano bonificate prima di uscire dal laboratorio.
- Sistema che consenta la sterilizzazione di tutti i liquidi di scarico compresi gli scarichi delle docce.



(immagine tratta da materiale divulgativo INAIL, *Rischio Biologico nei Laboratori*)

#### LABORATORIO A CONTENIMENTO FISICO DI LIVELLO 4 (PCL4)

Oltre a quanto richiesto per il PCL 3, viene richiesto:

- Il laboratorio deve essere fisicamente separato da zone generalmente accessibili; la separazione deve essere ottenuta mediante ubicazione in un edificio isolato o isolando una parte dell'edificio.
- Sistema di camere di equilibrio con porte interbloccate; possibilità di chiudere a chiave e sigillare per la disinfezione. Sistema di ventilazione connesso alle camere di equilibrio per mantenere pressione negativa.
- Porta esterna dotata di un segnale (semaforo) che indichi i lavori in corso; le finestre devono essere non apribili, infrangibili ed a tenuta.
- Attrezzatura per il cambio completo e docce disponibili per il personale nella zona di equilibrio compresa un'area apposita dove lasciare i vestiti.
- Ogni indumento indossato in laboratorio deve essere sterilizzato prima di uscire dal contenimento.
- Il laboratorio deve essere ventilato tramite un condotto indipendente che porta aria dall'esterno e dotato di un sistema di scarico senza alcun riciclo di aria; deve essere mantenuto un'adeguata pressione negativa nel laboratorio e nel sistema di camere di equilibrio. L'aria in uscita deve essere filtrata da un doppio filtro HEPA mentre in entrata il filtro deve essere singolo.
- Il laboratorio deve contenere tutta l'attrezzatura che deve essere di uso esclusivo.
- Cappa di sicurezza biologica di classe III (UNI 12469)



(immagine tratta da materiale divulgativo INAIL, *Rischio Biologico nei Laboratori*)

La Norma Tecnica indica anche quali sono le necessità di spazio e le dimensioni da tenere in considerazione nell'allestimento di un laboratorio.

#### Spazi fra superfici di lavoro o attrezzature:

- spazio di passaggio 90cm – 150 cm
- un lavoratore senza passaggio 97,5 cm – 120 cm, con passaggio 105 cm – 135 cm
- due lavoratori, schiena contro schiena, senza passaggio 135 cm – 150 cm, con passaggio 165 cm – 195 cm

#### Altezza e profondità delle superfici di lavoro

Ovviamente le superfici devono essere alla minima altezza adatta a chi le usa. In via del tutto indicativa si danno alcune indicazioni rispetto alla relazione fra seduta e superficie di lavoro.

In piedi/sgabello (altezza seduta 58 cm) Altezza piano di lavoro 85 – 95 cm

Posizione seduta (altezza seduta 45 cm) Altezza piano di lavoro 70 – 75 cm

Spazio per le ginocchia: almeno 60 cm

Se non diversamente richiesto dagli allestimenti (p.e. necessità di posizionare attrezzature più larghe), la profondità di 60 cm consente di raggiungere agevolmente ogni punto della superficie di lavoro comprese le prese sulla parete.

La **Norma UNI 12741** invece tratta gli aspetti organizzativi del laboratorio inclusa la pianificazione della formazione ed addestramento del personale. La norma indica delle procedure generali sempre valide dopodichè specifica delle procedure addizionali da introdurre a seconda del livello di contenimento.

Nelle **indicazioni generali** sono inclusi i comportamenti corretti universalmente riconosciuti come:

- sono vietate le attività che possono comportare contatto di materiale pericoloso con cute o bocca; è vietato introdurre in laboratorio, consumare o conservare cibi o bevande (con esclusione di quelli da sottoporre ad analisi – campioni) così come è vietato fumare, assumere farmaci o applicare cosmetici nelle aree di laboratorio.
- Il personale deve rispettare le misure minime di igiene come lavarsi le mani prima di iniziare il lavoro, tutte le volte che si è manipolato del materiale pericoloso nonché prima di lasciare il laboratorio e dopo aver tolto gli indumenti protettivi (DPI). Le mani vanno asciugate con salviette usa e getta o analoghi; solo se necessario si deve procedere anche con una disinfezione delle mani.
- Spesso alcuni tipi di infortuni possono essere aggravati da capelli lunghi, dai gioielli, da certe tipologie di scarpe (p.e. scarpe aperte) o di abiti larghi pertanto è necessario fare attenzione all'abbigliamento in laboratorio.
- È severamente vietato pipettare a bocca; devono essere utilizzati sempre dispensatori automatici.
- È necessario minimizzare la produzione di aerosol contaminato; se è probabile la produzione di aerosol contaminato allora è necessario trasferire l'attività all'interno del contenimento di una cappa di sicurezza biologica. Si ricorda che la barriera protettiva sull'operatore attuata da una cappa di sicurezza biologica può essere compromessa da situazioni che ne perturbano il flusso di aspirazione interni come persone che passano

alle spalle dell'operatore, correnti d'aria, etc.; è necessario quindi prestare particolare attenzione a queste situazioni per evitare contaminazioni esterne.

- Il laboratorio deve essere ordinato e pulito e non deve contenere nulla che non sia necessario per l'attività ivi svolta.
- Le superfici di lavoro, comprese le cappe di sicurezza biologica, devono essere decontaminate, utilizzando procedure validate, ogni volta che vi sia stato un versamento di materiale biologico, quando si termina un ciclo di lavoro ed al termine della giornata di lavoro.
- È obbligatorio indossare i DPI che devono essere lasciati in laboratorio o nello spogliatoio (se presente) nel momento in cui si esce. Gli abiti non di lavoro devono essere lasciati al di fuori dell'area di lavoro
- In ogni area di lavoro oppure durante lo svolgimento di alcune procedure particolarmente critiche è necessario assicurarsi che ogni lavoratore sia sempre contattabile.
- Deve essere attuato un adatto programma di controllo dei vettori (insetti, topi, etc.)
- L'uso di taglienti e aghi cavi deve essere, dove possibile, evitato. Laddove debbano essere utilizzati è necessario istituire una procedura per l'utilizzo, trasporto ed eliminazione in sicurezza.
- Le dotazioni di laboratorio devono essere conformi alle specifiche Normative Tecniche e devono essere scelte in base alla facilità di decontaminazione ed alla minimizzazione del rischio di contaminazioni interne al laboratorio. La manutenzione e la riparazione delle dotazioni di laboratorio (apparecchiature, cappe, etc.) deve essere affidata a personale esperto che deve essere autorizzato all'intervento e messo nelle condizioni di non venire a contatto con patogeni pericolosi. Le attrezzature devono essere posizionate in modo stabile e lontane dalla raccolta rifiuti.
- I piccoli versamenti di materiale contaminato devono essere trattati in maniera efficace per esempio, coprendo l'area o l'apparecchiatura con salviette imbevute di soluzione disinfettante che andranno poi rimosse. L'operazione deve essere effettuata indossando i guanti; salviette e guanti vanno eliminati nei rifiuti biologici. Eventuale vetreria rotta deve essere messa in appositi contenitori rigidi. Tutto ciò che è stato interessato dal versamento deve essere decontaminato seguendo procedure validate. Tutte gli operatori del laboratorio devono essere informati circa tutti gli incidenti che avvengono.

### **Formazione ed addestramento**

Al di là della formazione obbligatoria per i lavoratori, gli operatori devono ricevere ulteriore adeguata formazione ed addestramento riguardo le corrette modalità operative ed ai rischi associati alle mansioni che gli vengono richieste. È importante verificare che le indicazioni di sicurezza impartite siano state ben comprese per evitare errori umani o pratiche non corrette. Tale attività di formazione ed addestramento deve essere ripetuta qualora siano stati introdotti nuovi protocolli di ricerca, nuove metodiche oppure nuove attrezzature o dotazioni. Inoltre deve essere chiaramente individuato il soggetto (responsabile di laboratorio, Responsabile della Didattica e della Ricerca) cui compete l'attività di formazione ed addestramento nonché le persone destinatarie di tale formazione. Una copia delle istruzioni di sicurezza impartite deve essere disponibile in laboratorio.

### **Gestione del rischio**

I protocolli di laboratorio devono essere progettati tenendo conto delle misure di prevenzione e protezione da adottare rispetto ai rischi presenti in laboratorio (generali, chimici, fisici, biologici).

Il personale deve essere istruito ed addestrato per fronteggiare i rischi e deve conoscere quanto richiesto dalle normative e regolamenti vigenti. Il personale deve essere edotto rispetto l'utilizzo di sostanze chimiche pericolose (cancerogeni, mutageni, teratogeni, tossici, radioattivi, etc.) e la manipolazione di agenti biologici conoscendo le specifiche misure di contenimento previste per le singole classi di patogeni.

Quanto fin'ora detto vale per tutti i laboratori biologici anche se in essi non è prevista la manipolazione di agenti biologici classificati come partogeni. A queste misure gestionali di carattere universale ne vanno aggiunte altre qualora si preveda la manipolazione di agenti biologici classificati.

### **Livello di contenimento 2**

- a) i laboratori devono presentare la segnaletica di avvertimento riguardo il livello di rischio biologico presente; il simbolo indicante il rischio biologico deve essere affisso anche agli incubatori, frigoriferi, freezer, etc. in special modo se collocati fuori dal laboratorio;
- b) l'accesso al laboratorio deve essere riservato alle persone autorizzate;
- c) dove necessario, dotarsi di occhiali o schermi facciali;
- d) l'iniezione o l'aspirazione di materiale contaminato deve essere effettuata con siringhe con ago interbloccato oppure con ago usa e getta. L'uso di siringhe deve prevedere particolari cautele al fine di evitare punture accidentali o produzione di aerosol. Non reincapucciare mai gli aghi. Dopo l'uso gli aghi ed ogni altro tagliente deve essere messo in apposito contenitore rigido di raccolta rifiuti;
- e) il materiale biologico deve essere conservato e stoccato in un posto sicuro e chiaramente identificato; i singoli contenitori devono essere etichettati ed accessibili solo a persone autorizzate;
- f) gli animali deliberatamente inoculati con agenti biologici classificati devono essere stabulati rispettando le misure di contenimento previste per la corrispondente classe di rischio;
- g) i rifiuti devono essere posizionati lontano dalle aree di lavoro, in contenitori resistenti e correttamente etichettati;
- h) le attrezzature che facilmente si contaminano (cappa biologica, centrifuga, etc.) devono essere decontaminate al termine della giornata di lavoro;
- i) non tenere in laboratorio animali e piante non coinvolte nella sperimentazione.

### **Livello di contenimento 3**

In aggiunta alle misure precedenti (misure universali e misure per il livello 2):

- a) in laboratorio devono essere indossati camici chiudibili, guanti, calzature da laboratorio ed occhiali di sicurezza; potrebbero essere richiesti in aggiunta schermi facciali, copriscarpe, maschere, etc.
- b) tutti i rifiuti liquidi e solidi ed i materiali contaminati, di qualsiasi volume essi siano, devono essere decontaminati prima di lasciare il laboratorio.
- c) il trasporto di materiale biologico dal laboratorio di livello 3 deve essere condotto in accordo con procedure rigorose che prevedano l'utilizzo di contenitori adeguati;
- d) gli indumenti di laboratorio devono essere decontaminati prima di essere lavati inoltre devono essere tolti prima di lasciare il laboratorio e decontaminati prima di essere riutilizzati o eliminati.

### **Livello di contenimento 4**

In aggiunta alle misure precedenti (misure universali, misure per il livello 2 e per il livello 3):

- a) accesso consentito al laboratorio solo a persone autorizzate e solo attraverso un dispositivo di interblocco;
- b) gli operatori che accedono al laboratorio devono cambiare tutti gli indumenti compresa la biancheria intima. Al termine del lavoro l'abbigliamento di laboratorio deve essere rimosso nella zona "sporca" e riposto in un contenitore per l'autoclavaggio. Prima di lasciare l'area di lavoro deve essere fatta una doccia.

c) devono essere disponibili un numero sufficiente di autorespiratori o di maschere protettive delle vie respiratorie.

### **Gestione degli incidenti di laboratorio**

In laboratorio è necessario mettere a punto una serie di procedure di emergenza per far fronte ad eventuali infortuni personali oppure incidenti che potrebbero facilmente diventare dannosi per l'ambiente. Le procedure di emergenza devono essere riaccordate con il piano di emergenza e periodicamente devono essere effettuate delle simulazioni per testarle. In particolare devono essere messi a punto specifici metodi di disinfezione ed una procedura specifica applicabile al personale; inoltre gli addetti al primo soccorso devono ricevere specifiche indicazioni che periodicamente vanno rinnovate.

L'equipaggiamento di emergenza deve essere conservato all'esterno ma molto vicino all'area di lavoro.

Le azioni da intraprendere in caso di emergenza devono essere descritte in un documento accessibile a tutti e portato all'attenzione di tutto il personale. Le indicazioni ivi riportate devono essere appropriate per la tipologia di agente biologico manipolato e non devono pregiudicare le misure generali di sicurezza. A tutti gli operatori di laboratorio devono essere trasmesse le strategie di gestione degli incidenti in laboratorio al momento del primo ingresso e con periodicità almeno annuale.

### **Procedura in caso di grandi contaminazioni**

La formazione di aerosol è l'implicazione più rilevante di un veramento accidentale di materiale contaminato.

In questi casi le azioni da intraprendere sono:

- evacuare il personale dall'area, cercando di evitare l'area contaminata;
- confinare la zona contaminata
- informare i Responsabili di Laboratorio
- se è necessario rientrare nella zona contaminata prima che l'aerosol si sia depositato, indossare abiti protettivi adatti
- coprire l'area interessata dal vesamento con materiale adsorbente imbevuto di disinfettante efficace; l'area deve essere allagata con il disinfettante oppure è necessario fumigare la stanza
- dopo aver atteso il tempo necessario affinché il disinfettante esplichi la sua azione, provvedere alla pulizia dell'area
- quanto utilizzato per le operazioni di decontaminazione deve essere a sua volta decontaminato oppure eliminato nei rifiuti a rischio biologico

### **Pulizia e manutenzione**

È necessario assicurarsi che il personale addetto alla pulizia del laboratorio oppure alla pulizia e manutenzione delle dotazioni/apparecchiature non siano esposti a rischio biologico. I responsabili dei laboratori, al termine delle operazioni di pulizia condotte da terzi, devono assicurarsi che il laboratorio sia stato lasciato nelle condizioni adeguate per poter riprendere il lavoro. Se non è possibile sospendere le attività o comunque garantire che i lavoratori esterni non siano esposti a rischio biologico, allora va vietato l'ingresso.

Si suggerisce di pulire periodicamente pareti e pavimenti; le superfici di lavoro vanno invece pulite regolarmente ed ogniqualvolta vi sia un imbrattamento o un versamento accidentale.

I metodi ed i programmi di pulizia del laboratorio devono essere impostati tenendo conto del tipo di attività, del tipo di superfici da pulire, della quantità e del tipo di sporco presente e dell'intensità di frequentazione del laboratorio da parte del personale.

## **Decontaminazione**

In laboratorio devono essere utilizzati metodi di decontaminazione appropriati; nel 3° e 4° livello di contenimento i metodi di decontaminazione devono essere validati.

La miglior pratica in assoluto è la decontaminazione in autoclave.

In laboratorio deve essere presente una procedura in cui viene chiaramente specificato il metodo di decontaminazione e/o di disinfezione. La procedura deve riportare la tipologia di disinfettante e la sua concentrazione. La scelta dei prodotti e delle procedure di pulizia e decontaminazione deve necessariamente tenere conto della tossicità sull'uomo.

Tutto ciò che non può essere autoclavato o incenerito in laboratorio deve essere messo in un contenitore con coperchio che deve essere chiuso prima di lasciare il laboratorio.

Il materiale che deve essere autoclavato e riutilizzato deve essere posto in contenitori chiusi per autoclave. Se possibile effettuare un pre-lavaggio che previene la dispersione di microrganismi.

Nella norma tecnica EN 12469 è descritto il metodo da seguire per la fumigazione di una cappa biohazard.

Gli indumenti e presidi devono essere posti in un contenitore con coperchio vicino alla postazione di lavoro prima di essere autoclavati o disinfettati. I bidoni per i rifiuti di laboratorio non devono essere riempiti fino all'orlo.

La superficie esterna delle apparecchiature che spesso viene toccata potrebbe essere contaminata da agenti patogeni pertanto è necessario trattarle regolarmente con soluzione detergente, disinfettante o entrambe; lo stesso vale per altre dotazioni di laboratorio come telefoni, computer, maniglie, etc.

Nell'Allegato A alla Norma Tecnica EN 12741 si danno indicazioni rispetto all'utilizzo degli isolatori.

### 3. LABORATORI A RISCHIO BIOLOGICO POTENZIALE

Si configurano come attività a potenziale rischio biologico tutte quelle lavorazioni che possono determinare il contatto con agenti biologici patogeni per l'uomo. Un elenco non esaustivo di queste attività è riportato all'allegato XLIV, D. L.vo 81/08 e smi:

1. Attività in industrie alimentari.
2. Attività nell'agricoltura.
3. Attività nelle quali vi è contatto con gli animali e/o con prodotti di origine animale.
4. Attività nei servizi sanitari, comprese le unità di isolamento e post mortem.
5. Attività nei laboratori clinici, veterinari e diagnostici, esclusi i laboratori di diagnosi microbiologica.
6. Attività impianti di smaltimento rifiuti e di raccolta di rifiuti speciali potenzialmente infetti.
7. Attività negli impianti per la depurazione delle acque di scarico.

Il TU sulla sicurezza e salute del lavoro fa specifico riferimento anche alla gestione del rischio biologico in:

- **strutture veterinarie e sanitarie** (art. 274) per le quali devono essere definite ed applicate procedure che consentono di manipolare, decontaminare ed eliminare senza rischi per l'operatore e per la comunità, i materiali ed i rifiuti contaminati. Nei servizi di isolamento, che potrebbero ospitare animali contaminati da agenti biologici di classe 3 o 4, si dovranno applicare le misure di contenimento per la classe corrispondente.
- **laboratori e stabulari** (art. 275) in cui si dovranno applicare almeno le misure corrispondenti al secondo livello di contenimento.

Qualora ci sia rischio di esposizione ad agenti biologici non ancora classificati oppure si possa supporre che tale rischio si evidenzi per contatto con materiale infetto, allora si applicheranno almeno le misure di contenimento per la classe 3 di pericolosità. Per i laboratori e gli stabulari il Ministero della Salute sentito l'Istituto Superiore di Sanità, può decidere misure di contenimento più elevate.

In via del tutto generale i laboratori che ricevono e manipolano matrici di origine umana, animale, vegetale o ambientale sono laboratori in cui si svolge attività a rischio biologico potenziale. In tabella (*fonte: criteri ed indirizzi per la tutela della salute e sicurezza in tema di valutazione del rischio biologico nelle attività istituzionali delle Agenzie per la Protezione dell'Ambiente, 93/2013*) sono riassunte alcune delle matrici più comuni.

	Tipologia di campione	Matrice
1	Alimenti di origine animale	Alimenti animali
	Animali (carcasse)	
2	Alimenti di origine vegetale	Alimenti
	Acque minerali	
3	Acque di mare (balneazione, difesa del mare)	Acque a bassa contaminazione
	Acque di piscina	
	Acque destinate al consumo umano	
	Acque superficiali	
	Acque sotterranee	
4	Acque di scarico	Acque ad elevata contaminazione
	Acque superficiali contaminate	
	Liquido d'infiltrazione e percolato	
	Acque portuali	
5	Aria ambienti confinati	Aria confinata
	Controllo qualità	
6	Superfici	Superfici
	Tamponi ambientali	
7	Sangue ed emoderivati	Clinica
	Urina	
	Liquido dialisi	
	Rifiuti sanitari	
8	Cosmetici	Varie
	Piume	
	Pollini	
9	Rifiuti indifferenziati da discarica	Rifiuti
	Compost	
	Sedimenti dei porti	
	Sedimenti di fiume	

In tutti i laboratori in cui si manipolano materiali con possibile contaminazione da agenti biologici patogeni per l'uomo esiste rischio potenziale di esposizione ad agenti biologici classificati pertanto si dovrà applicare il contenimento previsto per la classe 2; qualora in laboratorio si sospetti la presenza di agenti biologici non ancora classificati si applicherà invece il contenimento per la classe 3, o superiore se diversamente indicato dal Ministero della Salute.

### 3.1. COLTURE CELLULARI

Fra le attività trasversali alle varie discipline condotte in laboratorio merita attenzione, dal punto di vista dell'esposizione potenziale ad agenti biologici, l'allestimento ed il mantenimento di colture cellulari (linee cellulari,

microrganismi non patogeni, etc.). A queste pratiche può associarsi il rischio determinato da contaminazioni accidentali dei mezzi colturali mantenuti nel laboratorio ovvero da agenti biologici patogeni cresciuti in maniera anomala nei mezzi di coltura. La gestione di questa tipologia di rischio comprende, oltre all'applicazione delle buone pratiche di laboratorio, la redazione di procedure operative standard nelle quali si contempli una periodica verifica delle cellule in coltura e l'eliminazione, previa disattivazione e disinfezione specifica, di quelle che dovessero risultare contaminate in maniera anomala. Per questi laboratori si ritiene sufficiente l'applicazione del **secondo livello di contenimento** (Allegato XLVII, D. L.vo 81/08).

### 3.2. LABORATORI CON PRESENZA DI CAMPIONI BIOLOGICI DI ORIGINE ANIMALE

La manipolazione di campioni di origine animale può esporre l'operatore a rischio biologico qualora siano presenti nelle matrici agenti eziologici di zoonosi. Con il termine zoonosi si intende una qualsiasi malattia infettiva che può essere trasmessa dagli animali (escluso l'uomo) all'uomo, direttamente (contatto con la pelle, peli, uova, sangue o secrezioni) o indirettamente (tramite altri organismi vettori o ingestione di alimenti infetti). Molteplici sono gli agenti biologici causa di zoonosi così come i veicoli di infezione e le vie di trasmissione. Nella specifica situazione, oltre alle misure di prevenzione e protezione (misure igieniche, procedure di lavoro e per la disinfezione, sistemi di protezione collettiva ed individuale, corretta gestione dei rifiuti, etc.) già descritte in precedenza, sono di fondamentale ausilio, nella protezione dell'operatore, la formazione specifica e le informazioni rispetto alla provenienza della matrice. Per un approfondimento sulle zoonosi fare riferimento al **Attività di didattica e di ricerca a rischio biologico potenziale** redatto da questo Servizio.

Si ricorda che le zoonosi risultano soggette in Italia a denuncia obbligatoria. Gli esposti a rischio che presentano segni sospetti di infezione devono essere sottoposti a visita medica immediata (ex DPR 303/65). Le zoonosi sono considerate infortuni sul lavoro, come le altre malattie infettive contratte in ambito professionale, qualora sussistano le opportune condizioni di lavoro e la diagnosi clinica sia confermata dall'indagine sierologica.

#### APPROFONDIMENTO

##### **Encefalopatie spongiformi**

Nella disamina del rischio associato a manipolazioni di tessuti nervosi umani oppure all'attività con animali o prodotti di origine animale non va trascurata l'importanza di agenti biologici non convenzionali responsabili di encefalopatie spongiformi dell'uomo (Creutzfeld – Jacob, Kuru, sindrome di Stressman – Scheinker, insonnia fatale familiare) e degli animali (scrapie, encefalopatia spongiforme bovina, encefalopatia spongiforme felina). Recentemente si è prospettato il passaggio dell'infezione da animali ad uomo determinando una forma fin'ora sconosciuta, ora definita variante giovanile di Creutzfeld – Jacob (vCJD). In questo ambito una particolare attenzione dovrà essere posta alle manipolazioni che coinvolgono il cervello, gli occhi ed il midollo spinale di animali a sospetto di infezione. Importante sottolineare che le procedure di decontaminazione e disinfezione per questi agenti biologici non convenzionali si discostano da quanto valido per tutti gli agenti biologici convenzionali ovvero:

- la sterilizzazione in autoclave è efficace solo se condotta a 134°C per almeno 30';
- la disinfezione con agenti chimici deve essere effettuata utilizzando NaClO al 2% (1 g/L di Cloro disponibile) per almeno 24h oppure NaClO al 30% (15 g/L di Cloro disponibile) per almeno un ora. In alternativa nei casi in cui i materiali da trattare siano compatibili si può utilizzare NaOH 1N per almeno 1h.
- gli agenti chimici solitamente utilizzati per la disinfezione come etanolo al 70%, derivati del fenolo, formaldeide, etc. non hanno effetto sulla proteina prionica.

La corretta gestione delle attività legate alla presenza di prioni, compresa l'attività di ricerca, è riportata nelle LINEE GUIDA SULLE NORME DI SICUREZZA DA ADOTTARE PER LA MANIPOLAZIONE DI MATERIALE POTENZIALMENTE INFETTO DA AGENTI NON CONVENZIONALI NELLE PRATICHE DI LABORATORIO E NELLE OPERAZIONI DI PRELIEVO redatte dall' Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Servizio Prevenzione e Protezione - Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali.

La trasmissione uomo – uomo è ancora oggetto di studio; alcuni casi di Malattia di Creutzfeld – Jacob sono stati associati all'esecuzione di procedure mediche con l'utilizzo di materiale biologico contaminato o ferri chirurgici non correttamente decontaminati. Altri episodi sono relazionabili all'utilizzo di elettrodi cerebrali non decontaminati oppure a terapie con ormone della crescita e gonadotropine oppure ancora ad interventi quali trapianti di cornea e trapianto di dura madre. Nel 2004 erano segnalati 38 casi di Malattia di Creutzfeld – Jacob (9 infermieri e 24 medici) nel mondo, nessuno in Italia. In ogni caso non è stato mai accertato il collegamento fra un eventuale incidente ed il manifestarsi della malattia.

Dagli studi epidemiologici condotti pare che l'assistenza ai pazienti con Malattia di Creutzfeld – Jacob non sia a rischio per gli operatori, se questi non manipolano o vengono a contatto con materiale cerebrale. I tessuti considerati ad infettività elevata sono quelli del sistema nervoso centrale (cervello, midollo spinale, occhi).

### **Influenza aviaria**

In seguito alla particolare situazione riguardante l'allerta per l'influenza aviaria, gli organismi sanitari internazionali ed europei e gli enti nazionali di tutela della salute pubblica hanno emanato linee guida che definiscono fra l'altro le misure preventive e protettive da adottare in caso di attività che possano dare luogo a contatto con materiale contaminato dal Virus influenzale sia in operazioni da svolgere in campo o in allevamento che in operazioni che riguardano l'attività di analisi di laboratorio.

Per quanto concerne l'attività di sorveglianza epidemiologica sul territorio e in allevamento, la raccolta di campioni biologici da animali sospetti e di animali morti, la distruzione di carcasse, etc. molto dettagliato risulta essere il "MANUALE OPERATIVO IN CASO DI INFLUENZA AVIARIA" redatto in collaborazione da ISZ (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di referenza nazionale per l'Influenza aviaria e Laboratorio OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e per malattia di Newcastle) e CREV (Centro Regionale Epidemiologia Veterinaria Regione Veneto) in cui si riportano i dispositivi di protezione individuale da indossare, le metodologie corrette di disinfezione e di distruzione del materiale infetto.

Per le attività strettamente legate agli accertamenti di laboratorio si può fare riferimento alle "WHO laboratori biosafety guidelines for handling specimens suspected of containing avian influenza A virus" del gennaio 2005, e riportate in [www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza), dove si indica come generalmente adatto per manipolazioni di campioni sospetti il livello di contenimento BSL2 adottando procedure di lavoro compatibili con il 3° livello di contenimento (BSL3) qualora la contaminazione sia altamente probabile.

Per le attività che invece prevedono l'utilizzo deliberato dell'agente virale, come:

- test diagnostici che coinvolgono la propagazione del virus sia in vivo che in vitro
- operazioni che coinvolgono replicazioni del Virus influenzale A/H5 in colture cellulari e/o stoccaggio di colture cellulari isolate
- isolamento del virus influenzale A/H5 da campioni infetti
- manipolazioni che coinvolgono la crescita o la concentrazione di virus influenzale A/H5,

si dovrà operare in laboratori conformi sia nell'equipaggiamento di base che nelle pratiche di laboratorio al 3° livello di contenimento.

### 3.2.1. STABULARI

Il rischio biologico da zoonosi può essere considerato nullo negli stabulari in cui sono accuditi animali che, per necessità sperimentali, sono assolutamente privi di patologie in atto di qualsiasi genere. In questo tipo di attività resta un rischio biologico residuo di tipo allergico associato alla produzione di polvere (mangimi, lettieri, etc.) e/o ad eventuale ipersensibilità verso prodotti di origine animale (peli, forfora, secrezioni, etc.). Di conseguenza anche le attività di laboratorio che prevedono la manipolazioni di campioni prelevati da animali stabulati in genere è connotata da rischio biologico potenziale del tutto trascurabile.

Diversa è la situazione negli stabulari in cui si conservano animali deliberatamente inoculati con agenti biologici classificati; in questi contesti si dovranno applicare le misure di contenimento relative alla classe di pericolosità dell'agente biologico inoculato (ESPOSIZIONE DELIBERATA). Allo stesso modo nei laboratori in cui si manipolano tessuti o liquidi biologici provenienti da animali inoculati si deve applicare il livello di contenimento corrispondente.

Per gli stabulari in cui si potrebbe verificare la presenza di agenti patogeni per l'uomo o nei laboratori in cui si manipolano materiali con possibile contaminazione da agenti biologici patogeni per l'uomo si dovrà applicare il contenimento previsto per la classe 2; qualora in stabulario o in laboratorio si sospetti la presenza di agenti biologici non ancora classificati si applicherà invece il contenimento per la classe 3, o superiore se diversamente indicato dal Ministero della Salute.

Nelle attività che prevedono contatto con animali e/o prodotti di origine animale assume un'importanza rilevante l'incidenza di ipersensibilizzazioni. Lo sviluppo di tali patologie è più spesso associato al contatto con l'animale oppure alla frequentazione di ambienti in cui soggiornano animali (p.e. stabulari) che con l'attività di laboratorio. In realtà essendo gli stessi soggetti che operano in stabulario e in laboratorio ne risula che un sviluppo di questo tipo di ipersensibilità comporta una limitazione operativa non solo nello staulario ma anche in laboratorio.

### 3.2.2. MATRICI DI ORIGINE ANIMALE E/O VEGETALE E LE ALLERGIE

Nelle attività che prevedono contatto con animali e/o prodotti di origine animale assume un'importanza rilevante l'incidenza di soggetti ipersensibilizzati. Lo sviluppo di tali patologie è più spesso associato al contatto con l'animale oppure alla frequentazione di ambienti in cui soggiornano animali (p.e. stabulari) che con l'attività di laboratorio. In realtà essendo gli stessi soggetti che spesso operano in stabulario e in laboratorio, ne risula che un sviluppo di questo tipo di ipersensibilità comporta una limitazione operativa non solo nello staulario ma anche in laboratorio.

Lo sviluppo di queste patologie risulta anche associato alla manipolazione di matrici di origine vegetale per le quali costituisce la componente di rischio biologico più rilevante.

Ipersensibilità, allergie o particolari patologie sono spesso determinate da prodotti metabolici e/o di scarto che derivano dalla presenza di agenti biologici. Le particelle di origine biologica (bioaerosol) aerodisperse nell'ambiente di lavoro, causa frequente di sintomi allergici ad altre malattie, possono essere costituite da spore fungine, pollini, batteri, virus, lieviti, alghe, protozoi, frammenti o escrementi di insetti, scaglie di cute o peli di mammiferi, residui o prodotti di organismi come lipopolisaccaridi batterici (endotossine e micotossine). Le particelle coinvolte nelle patologie professionali sono fortemente dipendenti dal tipo di attività lavorativa.

Uno studio (Lutsky, I. 1987. *A worldwide survey of management practices in laboratory animal allergy. Ann. Allergy* 58: 243 – 7) ha evidenziato che tre quarti delle istituzioni con animali da laboratorio hanno stabularisti con sintomi di ipersensibilità. Le allergie si manifestano spesso con sintomi alle prime vie respiratorie, agli occhi ed alla cute. I sintomi compaiono mediamente dopo un periodo di esposizione di 1/2 anni. L'asma occupazionale, una patologia piuttosto grave, può svilupparsi nel 10% delle persone che hanno ipersensibilità e che lavorano in laboratori con animali. (Hunskaar S. and Fosse R., 1993. *Allergy to laboratory mice and rats: a review of its prevention, management, and treatment. Lab Anim.* 27: 206 – 21).

L'aria è il mezzo con cui più spesso gli allergeni vengono a contatto con gli operatori determinando diverse manifestazioni sia cutanee che respiratorie così come riassunto in tabella.

**Tabella: Reazioni allergiche agli allergeni di animali da laboratorio**

Disturbo	Sintomi	Segnali
Orticaria da contatto	Cute: rossore, prurito, ponfi, lividi	Manifestazione eritematosa circoscritta ed in rilievo
Congiuntivite allergica	Starnuti, prurito, muco chiaro e trasparente dal naso, congestione nasale	Congestione dei vasi congiuntivali, sensibilità chimica, muco chiaro bilaterale
Rinite allergica	Starnuti, prurito, muco chiaro e trasparente dal naso, congestione nasale	Mucosa nasale pallida ed edematosa, rinorrea
Asma	Tosse, affanno, fiato corto,	Affanno, temporanea ostruzione delle vie aeree, iperfunzionalità delle vie aeree.
Anafilassi	Prurito generalizzato, orticaria, gonfiore agli occhi ed alle labbra, difficoltà a deglutire, raucedine, respiro corto, vertigini, svenimento, nausea, vomito, crampi addominali, diarrea	Vampate, orticaria, angioedema, affanno, ipotensione.

Inoltre ogni specie animale provoca diverse reazioni allergiche a seconda della tipologia di allergeni prodotti:

- ☒ Ratto: proteine urinarie e della saliva
- ☒ Topo: proteine urinarie
- ☒ Cavia: componenti allergeniche nella forfora, pelliccia, salive e urina.
- ☒ Coniglio: pelliccia e in misura minore nella saliva e nelle urine
- ☒ Cane: saliva, pelo e pelle
- ☒ Primati: l'ipersensibilità nel caso primati è poco diffusa; in ogni caso una qualche attività allergenica è stata riscontrata nella forfora.
- ☒ Suini: L'asma ed altri sintomatologie respiratorie sono state attribuite al contatto con suini particolarmente in attività di allevamento. In realtà i sintomi sembrano più che altro correlati ad alte concentrazioni azoto. Alcuni allergeni sono stati isolati dalle urine.
- ☒ Bovini: l'ipersensibilità ai bovini riguarda il 15-20% degli allevatori di vacche da latte anche se le proteine causa dell'allergia non sono ancora state individuate. Alcuni allergeni sono stati isolati nella forfora e nelle urine.
- ☒ Equini: gli equini sono una fonte di potenti allergeni isolati dalla forfora, dalle scaglie di cute e dall'albumina.
- ☒ Ovini: può determinare dermatiti da contatto dovute alla lanolina.
- ☒ Cervo: Alcune persone mostrano sensibilizzazione alle proteine del cervo; essitono inoltre prove di sensibilità crociata fra le proteine del cavallo e quelle del cervo.
- ☒ Uccelli: sintomi quali riniti ed asma sono associate all'esposizione a volatili che risultano anche responsabili della polmonite da ipersensibilità; sia i fenomeni di carattere allergico che ipersensibile sono mediati dalla reazione fra alcune proteine allergeniche e le immunoglobuline IgG.
- ☒ Rettili: raramente l'uomo è allergico a rettili o anfibi. In letteratura è stato descritto solo un caso di asma occupazionale dovuto ad esposizione a proteine della rana.
- ☒ Pesci: le proteine del pesce (pesci, crostacei e molluschi) sono problematiche per soggetti già sensibilizzati per via inalatoria e possono determinare asma e riniti allergiche.
- ☒ Insetti: operatori che lavorano in laboratori in cui possono essere esposti a scagli di tessuto proveniente da farfalle, bruchi ed altri insetti mostrano sensibilizzazione, mentre sintomi quali orticaria, rinite ed asma sono collegati all'esposizione a proteine dei maggiolini, dei vermi della farina e degli scarafaggi. (*Fonte: Occupational Health and Safety in Care and Use of Research Animals, National Research Council, Ed. National Academy Press, 1997*).

Le misure preventive coinvolgono essenzialmente l'attuazione di procedure organizzative ed operative quali il mantenimento di condizioni ambientali sfavorevoli alla diffusione di allergeni (velocità dell'aria, controllo dell'umidità relativa e della temperatura, etc.), l'applicazione di rigorose procedure di igiene ambientale e personale (periodicità di pulizie e disinfezioni dell'ambiente, adozione di procedure per le pulizie che minimizzino la produzione/diffusione di polveri e la formazione di bioaerosol, metodicità nel lavaggio delle mani e/o delle parti eventualmente esposte, etc.). Concorrono inoltre alla limitazione dell'esposizione tutti quei sistemi automatici che permettono di limitare al massimo la produzione e la diffusione di polveri (nastri per l'allontanamento delle deiezioni degli animali, distributori/dosatori automatici per i mangimi, sistemi localizzati di aspirazione, sistemi di filtraggio del particolato,

etc.). A queste misure, peraltro non sempre applicabili, deve essere integrato l'utilizzo scrupoloso dei dispositivi di protezione individuale quali:

- mascherina protettiva dall'inalazione di polveri
- Guanti, occhiali, grembiuli, calzari, etc. per la protezione della cute e delle mucose dal contatto diretto e prolungato con la polvere.

### **3.3. LABORATORI CON PRESENZA DI CAMPIONI BIOLOGICI DI ORIGINE UMANA**

La manipolazione di campioni di origine umana comporta rischi assimilabili a quelli presenti nelle attività di tipo assistenziale. Nello specifico gli operatori sanitari devono attenersi alle PRECAUZIONI STANDARD (per la trasmissione ematica) ovvero idonee procedure barriera da adottare per prevenire l'esposizione parenterale, cutanea e mucosa nei casi in cui si preveda un contatto accidentale con sangue o altri liquidi biologici. Tali raccomandazioni devono essere applicate a tutte le persone che accedono alla struttura sanitaria quando si eseguono procedure assistenziali, diagnostiche e terapeutiche che prevedono un possibile contatto accidentale con sangue e altro materiale biologico ovvero quando si manipolano strumenti, presidi o attrezzature che possono provocare un contatto accidentale con sangue e altro materiale infetto. A queste si aggiungono le PRECAUZIONI AGGIUNTIVE che riguardano l'eventuale trasmissione per via aerea, droplet e contatto. (aggiornamento recepito dalle "Linee guida per le precauzioni di isolamento in ospedale", C.D.C Atlanta, 1996)

Le PRECAUZIONI STANDARD prevedono una serie di norme comportamentali che riguardano:

- ✓ Igiene delle mani
- ✓ Igiene dell'ambiente
- ✓ Eliminazione dei rifiuti
- ✓ Trattamento della biancheria
- ✓ Precauzioni nell'utilizzo di aghi e taglienti
- ✓ Trasporto dei campioni biologici
- ✓ Trattamento dei dispositivi medici riutilizzabili (sempre decontaminazione e pulizia seguite da disinfezione o sterilizzazione a seconda del tipo di articoli in base all'infettività ovvero se si tratta di articoli non critici, semicritici o critici)
- ✓ Dispositivi di Protezione Individuale (Protezione respiratoria – mascherine, facciali filtranti – e protezione mucosa/cutanea – Guanti, Camici, Visiere/Occhiali, Copricapo, Copriscarpe)
- ✓ Dispositivi di Sicurezza per la Protezione dalle punture accidentali.

Le PRECAUZIONI STANDARD, dove possibile, vanno applicate anche alle attività laboratoristiche che prevedono la manipolazione di campioni biologici di origine umana; nello svolgimento di queste attività l'operatore deve SEMPRE comportarsi come se i materiali coinvolto fossero infetti.

I principi generali di tutela costituiti dalle precauzioni standard devono tradursi in specifiche misure di prevenzione e protezione ovvero:

- 1) procedura operativa standard che prenda in esame le singole fasi di lavoro ed i relativi rischi con particolare attenzione alle pratiche che possono generare infortunio (uso di attrezzatura acuminata o tagliente – bisturi, trapano, sgrafigli, etc.) o determinare contaminazione (proiezione di materiale organico).
- 2) procedure operative standard e di emergenza per disinfezione della attrezzatura e del locale

#### **SCHEDA INFORMATIVA**

##### **Principali procedure di decontaminazione e disinfezione**

E' importante che il personale di laboratorio conosca ed applichi idonei protocolli di disinfezione. Per casi specifici sono state redatte delle procedure operative o delle linee guida per la manipolazione di particolari agenti biologici: per esempio il DM 28/09/1990 "Norme di protezione dal contagio professionale di HIV nelle strutture sanitarie ed assistenziali pubbliche e private".

##### **Decontaminazione e disinfezione delle superfici di lavoro e degli oggetti**

Per la vetreria, dove non fosse possibile l'utilizzo di materiale usa e getta, è indispensabile ricorrere alla disinfezione in autoclave. Si dovrà aver cura inoltre di acquistare attrezzature (centrifughe, strumenti, etc.) facilmente decontaminabili.

Fra i disinfettanti di riconosciuta efficacia e di più largo utilizzo ricordiamo:

-glutaraldeide al 2% attivata indicata per materiale da laboratorio, plastica, gomma e metallo; è attivo sulle spore a temperature superiori ai 20°C. Non va utilizzata su superfici e piani di lavoro; è tossica per cute e mucose pertanto il suo utilizzo richiede che si indossino guanti ed occhiali protettivi.

-derivati fenolici (es. o-fenilfenolo) utilizzati come disinfettanti per pavimenti e superfici, non adatti per plastiche, gomme e siliconi sui quali vengono assorbiti. Sono irritanti per cute e mucose quindi richiedono l'utilizzo di guanti ed occhiali protettivi.

-cloramina T, ipoclorito di sodio (candeggina) sono i disinfettanti di prima scelta per superfici contaminate o sporche di sangue; sono consigliate concentrazioni di 5000-10000 ppm. Sono prodotti tossici pertanto sono da applicare indossando guanti e occhiali protettivi.

Le superfici di lavoro devono essere decontaminate almeno due volte al giorno: prima di iniziare il lavoro ed al termine della giornata. Le superfici verticali vanno disinfettate almeno una volta al mese. Nei laboratori che utilizzano agenti biologici a basso rischio (classe 1 e 2) può essere impiegata una soluzione di composti dell'ammonio quaternario o una soluzione al 70-80% di alcool etilico.

Nei laboratori a più alto rischio (agenti biologici di classe 3), anche se i microrganismi devono essere manipolati solo sotto cappa di sicurezza, è opportuno decontaminare le superfici dei banchi con composti fenolici o derivati dello iodio seguita da un'applicazione di alcool al 70-80% per rimuovere i residui del primo disinfettante. La prima soluzione va applicata con un panno (monouso e di carta) imbevuto (utilizzare i guanti); dopo 5 minuti di contatto si procede alla pulizia finale con un panno nuovo imbevuto di alcool. Il materiale utilizzato per la pulizia va eliminato nei contenitori dei rifiuti biologici.

##### **Procedure operative per le emergenze (infortunio, spandimenti accidentali, etc.)**

##### **Decontaminazione e disinfezione dei pavimenti**

I derivati del fenolo ed i composti dell'ammonio quaternario sono i principali disinfettanti indicati per la decontaminazione dei pavimenti. Il metodo raccomandato per la decontaminazione dei pavimenti è quello che utilizza due secchi: uno contenente la soluzione "pulita" di disinfettante, da applicarsi sul pavimento, e l'altro per la soluzione "sporca" raccolta da terra. Lo straccio imbevuto di disinfettante viene leggermente strizzato nel secchio "sporco" ed applicato sul pavimento; dopo un tempo di contatto di almeno 5 minuti, la soluzione viene rimossa ed eliminata nel secchio "sporco". E' necessario utilizzare ogni giorno uno straccio pulito; dopo l'uso lo straccio deve essere immerso in una soluzione pulita di disinfettante per almeno 30 minuti oppure autoclavato.

**Procedure di decontaminazione e di disinfezione in caso di spargimento di materiale contaminato**

Dopo aver indossato gli indumenti protettivi si coprirà l'area contaminata con carta assorbente e vi si verserà sopra una soluzione concentrata di disinfettante e si lascia agire per 20 minuti (ad esempio ipoclorito di sodio). Si dovranno raccogliere i frammenti eventualmente caduti, si asciugherà l'area contaminata che andrà poi spruzzata di nuovo con il disinfettante. Nel caso che il campione versato sia costituito da sangue o da altro fluido biologico è necessario rimuovere bene ogni traccia di materiale organico prima di procedere alla vera propria approfondita disinfezione.

Tutto il materiale utilizzato per le operazioni di decontaminazione sarà assimilato ai rifiuti biologici nel caso di materiale usa e getta oppure sarà sterilizzato in autoclave in caso di materiale riutilizzabile.

Per far fronte rapidamente alle situazioni di emergenza è utile preparare un "kit di decontaminazione" che dovrà contenere:

- ipoclorito di sodio concentrato
- bottiglia spray da riempire con la diluizione del disinfettante
- pinze e/o palette usa e getta
- carta assorbente
- sacchi "biohazard" per autoclave
- guanti monouso
- dispositivi di protezione per il viso

3) Dispositivi di protezione individuale per rischio biologico (guanti, mascherine, schermi facciali) anche di protezione contro tagli e punture (p.e. guanti antitaglio)

DPI e normativa tecnica di riferimento	Alcuni esempi di attività
Guanti protettivi dall'esposizione ad agenti biologici (Norma UNI 374/1, 2 e 3). 	Manipolazione campioni biologici umani.
Schermi facciali (Norma UNI 166)	Manipolazione di materiale biologico in genere con possibilità di proiezione di materiale infetto.
Occhiali con schermi laterali (Norma UNI 166)	Manipolazione di materiale biologico in genere con scarsa possibilità di proiezione di materiale infetto
Facciale filtrante (Marcato CE richiedendo la resistenza alla penetrazione microbiologica)	Manipolazione di materiale biologico in genere con probabile produzione di aerosol
Guanti in maglia metallica (esempio)	Per attività di rifinitura dei provini con utilizzo di taglienti (bisturi). Manipolazione dei provini lesionati.

4) informazione, formazione ed addestramento specifici e tracciabili per gli operatori di laboratorio.

**APPROFONDIMENTO**

Le principali patologie connesse con l'utilizzo di campioni di derivazione umana riguardano le infezioni a trasmissione ematica (epatite B, epatite Delta, epatite C, infezione da HIV).

**Infezioni per via parenterale**

L'agente eziologico dell'**epatite B** è un virus a DNA ad alta infettività; le vie di trasmissione più importanti sono quella parenterale o percutanea (attraverso tagli, punture, trasfusioni, emoderivati); quella sessuale (attraverso lesioni delle mucose genitali, lesioni della mucosa orale); quella materno-fetale e quella perinatale (al momento del parto). Questo virus risulta stabile nel plasma o nel siero e può sopravvivere in diverse condizioni di temperatura ed umidità. Pertanto sono sufficienti minime tracce di sangue per rendere contagianti i vari liquidi biologici. Il virus dell'epatite B è una

particella sferica che risulta costituita da un nucleocapside interno, denominato core e da un involucro esterno che si replica all'interno degli epatociti.

Tra gli operatori sanitari la trasmissione del virus dell'epatite B avviene prevalentemente attraverso puntura con ago o strumento tagliente contaminato, oppure in seguito al contatto accidentale con sangue infetto per soluzioni di continuo della cute od ancora per contaminazione di membrane mucose. È stato valutato che il rischio di contrarre l'epatite B per una singola esposizione accidentale sia compreso tra il 2 ed il 40%, tenuto conto dello stato HbeAg positivo o negativo del soggetto fonte di infezione. In coloro che hanno contratto l'infezione, la quasi totalità guarisce completamente, una minima parte (5-10%) diviene portatore cronico del virus; in quest'ultima un quarto può sviluppare un'epatite cronica attiva che successivamente può evolvere in cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare; una piccolissima percentuale, lo 0,5-1% di questi soggetti, va incontro ad epatite acuta fulminante che per lo più è a decorso mortale. Pur persistendo un apprezzabile pericolo di esposizione a fonte HBV positiva l'infezione occupazionale è divenuta un evento raro.

L'**epatite delta** è un'infezione determinata da un virus a RNA che tuttavia per produrre la malattia richiede l'associazione con il virus dell'epatite B, che in tal caso funziona come virus helper. Per l'operatore sanitario attualmente non dovrebbe sussistere il rischio di infezione Delta nella sua attività di lavoro, dal momento che dovrebbe essere vaccinato contro l'epatite B; con tale vaccinazione in effetti si ha la protezione sia contro l'epatite B che contro l'epatite B-Delta.

L'**epatite C** è determinata da un virus a RNA la cui trasmissione avviene principalmente per via parenterale, altre vie sono quella perinatale e sessuale, quest'ultime però meno efficienti. La prevalenza di HCV negli operatori sanitari è risultata generalmente simile a quella della popolazione generale di riferimento. Negli ultimi anni l'incidenza di epatite C acuta è risultata invece significativamente più alta negli operatori sanitari (1.6 per 100.000 abitanti) rispetto alla popolazione generale (0,6), e numerosi casi continuano ad essere osservati. Il tasso di trasmissione per singola esposizione occupazionale è compreso tra lo 0,5% e l'1,8%. Nell'ambito del SIROH, sono state osservate 30 siero conversioni per HCV (26 dopo puntura con ago cavo) su oltre 7.000 esposizioni percutanee ed altre 2 dopo esposizione congiuntivale a sangue.

Negli ultimi anni sono stati identificati, oltre a questi già conosciuti, altri virus epatotropi, tra i quali possiamo ricordare solo quelli a trasmissione parenterale, come ad esempio il virus G, che è un virus a RNA, capace di determinare infezioni sia acute sia croniche.

Il **virus HIV**, responsabile della sindrome dell'immunodeficienza acquisita, è un virus a RNA, in genere poco resistente all'ambiente esterno. Tale virus è presente nelle secrezioni e nei liquidi corporei; infatti il sangue, il liquido seminale, le secrezioni vaginali sono fondamentali per la trasmissione di questo virus, ricordando tuttavia che teoricamente da tutti i liquidi contenenti linfociti infetti può derivare un potenziale contagio. Le più importanti vie di trasmissione sono pertanto quella parenterale o percutanea, quella sessuale, quella materno-fetale e quella perinatale.

Dopo un'esposizione di tipo percutaneo con sangue infetto, il rischio professionale si aggira intorno allo 0,3%; risulta maggiore quando vi siano o una lesione profonda dell'operatore o la contaminazione massiva a livello congiuntivale o sangue sul mezzo lesivo. Inoltre può aumentare allorchè lo strumento che ha provocato la lesione è stato posizionato in un'arteria o in una vena del soggetto infetto, oppure quando il paziente infetto sia deceduto per AIDS nei 60 giorni dall'esposizione. Negli ultimi anni le segnalazioni di casi di infezione occupazionale da HIV nella letteratura sono diminuite, probabilmente anche come effetto secondario positivo del trattamento dei pazienti e del ricorso alla profilassi post-esposizione (PPE) con antiretrovirali. Le più recenti segnalazioni sono riferibili a casi associati a resistenza ai farmaci nel ceppo del paziente fonte o alla mancata assunzione della profilassi post-esposizione. Dal 1997, quando si sono resi disponibili trattamenti e profilassi di combinazione efficaci contro l'HIV, al 2007 su un totale di circa 1000 esposizioni ad HIV riportate è stato osservato un solo caso di infezione.

## 4. DOTAZIONI ED ATTREZZATURE DI LABORATORIO

### 4.1. CAPPE BIOLOGICHE

#### Caratteristiche dei sistemi di filtrazione

L'abbattimento delle particelle solide in sospensione è importante sia nel proteggere l'operatore da eventuali contaminazioni sia nel creare un ambiente sterile e depolverizzato.

Per quanto riguarda la contaminazione particellare, la classe ambientale universalmente accettata per il campo biologico è la classe 100 cioè il conteggio delle particelle con diametro 0,5 µm risulta inferiore a 100 per piede cubico (3,5 particelle/litro).

Per quanto concerne le particelle biologicamente attive si definisce un limite massimo in CFU (Colony Forming Unit) nell'umidità dell'aria e depositata sulla superficie in 7 giorni; per un ambiente di classe 100 e di interesse biologico il CFU deve essere inferiore a 0,1 per piede cubico d'aria (3,5 CFU/m<sup>3</sup>) con fall-out settimanale massimo inferiore ai 1200 per piede quadrato (=12900/m<sup>2</sup> settimana).

La purificazione dell'aria nei limiti della classe 100 si realizza facendo passare l'aria attraverso un filtro assoluto HEPA ad una velocità costante di 0,45 (± 20%) cm/sec; l'efficienza di ciascun filtro deve essere compresa fra 99,97% a 99,999% su particelle con diametro di 0,3 µm. I filtri con efficienza superiore a 99,999% sono definiti ULPA (Ultra Low Penetration Air).

#### Cappe a flusso laminare orizzontale

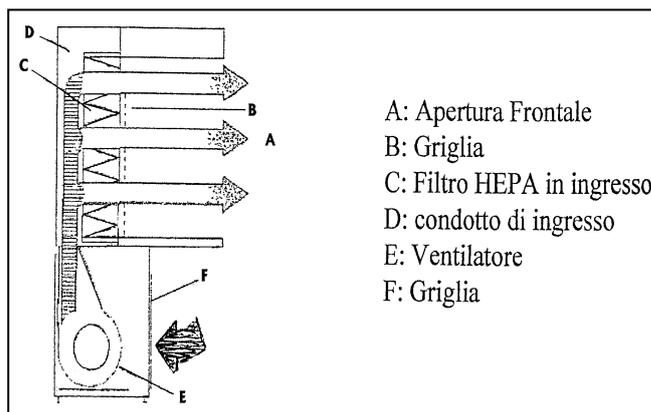
L'aria purificata dal filtro assoluto passa attraverso la parete di fondo della cappa e scorre parallela alla superficie di lavoro asportando le particelle in sospensione fuori dall'apertura frontale. Si crea un ambiente sterile o depolverizzato che protegge le sostanze in manipolazione ma non l'operatore che viene investito frontalmente dall'aria asportante i contaminanti. L'utilizzo di questi sistemi è limitato quindi ai casi in cui l'obiettivo primario è la protezione dei materiali che comunque non devono comportare rischi per l'operatore.

Lo schema di base del flusso orizzontale prevede:

- un prefiltro di materiale facilmente estraibile in materiale sintetico (spugna di poliuretano) lavabile in acqua o con aria compressa, per trattenere il pulviscolo grossolano dell'aria ambientale,
- un motoventilatore con possibilità di regolazione automatica che mantenga costante la velocità di flusso dell'aria (0,45 m/s)
- un filtro HEPA posto verticalmente nell'intercapedine della parete di fondo.

La cabina, costruita di solito in acciaio inossidabile o verniciato, ha il piano di lavoro in acciaio inossidabile o in laminato plastico, i pannelli laterali trasparenti (in cristallo temprato o di sicurezza) e il frontale aperto.

Può essere munita di impianto d'illuminazione e di lampada UV germicida. I comandi di regolazione e gli indicatori sono di solito sul fronte della cappa.



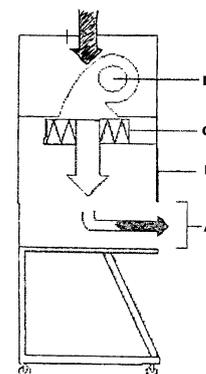
### Cappe a flusso laminare verticale

La geometria del flusso laminare verticale fa sì che il flusso d'aria proveniente dalla lavorazione non investa l'operatore in quanto esso è diretto verso il basso uscendo dal piano di lavoro traforato, l'operatore è quindi parzialmente protetto dai prodotti di evaporazione e di aerosolizzazione generati durante le manipolazioni.

La disposizione generale prevede la sistemazione orizzontale del filtro HEPA sul soffitto della cappa sotto la bocca del motoventilatore. L'aria prefiltrata viene spinta dal motoventilatore sul filtro assoluto, fluisce sterile e laminare in direzione verticale verso il piano di lavoro traforato e viene espulsa per circolazione attraverso le intercapedini verso il camino di scarico (espulsione totale), e di solito previa filtrazione assoluta, oppure in parte riciclata al motoventilatore (espulsione parziale).

Queste cappe differiscono da quelle con flusso orizzontale in quanto hanno un cristallo di sicurezza o temperato anteriore, che riduce l'area d'apertura, apribile per l'introduzione di apparecchi voluminosi. Il piano di lavoro è d'acciaio inossidabile e deve avere un bordo di contenimento; le regolazioni devono essere esterne.

A: Apertura Frontale  
 B: Pannello anteriore  
 C: Filtro HEPA in ingresso  
 D: Ventilatore



### Cappe di sicurezza microbiologica (CSB-Biohazard) UNI 12469:2001

Le cappe CBS garantiscono la protezione dell'operatore e dell'ambiente quando il campione è rappresentato da materiale biologico patogeno o potenzialmente tale

In base alle caratteristiche tecniche le cappe di sicurezza biologica sono divise in tre classi: I, II, III in grado di garantire livelli diversi di sicurezza. La scelta corretta della cappa sarà in funzione del livello di biosicurezza richiesto, dipendente a sua volta dalle caratteristiche del campione da trattare.

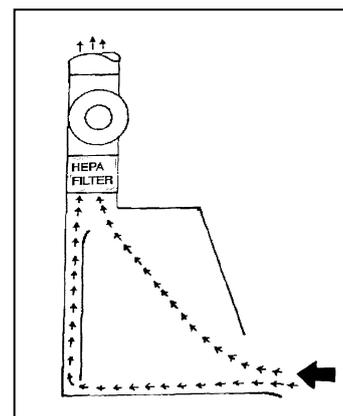
#### Cappe biologiche di classe I

Sono cappe con apertura frontale e richiamo di aria dall'esterno, l'aria, attraversato il vano cappa, viene filtrata da un filtro HEPA ed espulsa all'esterno. L'alta velocità frontale impedisce la fuoriuscita di aerosol potenzialmente pericolosi.

Sono valide per la difesa dell'ambiente e dell'operatore ma non hanno alcuna efficacia sulla protezione del prodotto. Questo tipo di cappa può essere utilizzato per la manipolazione di agenti biologici a basso rischio ovvero appartenenti ai gruppi 1 e 2.

#### Cappe biologiche di classe II

Le cabine Bio Hazard di 2° classe hanno caratteristiche variabili secondo le prestazioni e gli schemi produttivi delle differenti case produttrici. Sono basate sullo schema del flusso laminare verticale, con l'aggiunta di un filtro HEPA per la purificazione dell'aria espulsa, di dispositivi di sicurezza e presentano un maggiore fattore di contenimento degli aerosol all'interno della cappa. Queste caratteristiche la rendono utile per la manipolazione di agenti biologici a rischio medio ovvero microrganismi appartenenti ai gruppi 2 e 3.



In funzione dell'aerodinamica interna questa classe è suddivisa in quattro tipi:

-Classe II, tipo A: 30% di aria espulsa, 70% riciclata; velocità frontale 0,4 m/s.

-Classe II, tipo B1: 70% aria espulsa, 30% riciclata; velocità frontale 0,51 m/s.

-Classe II, tipo B2: 100% aria espulsa; velocità frontale 0,51 m/s.

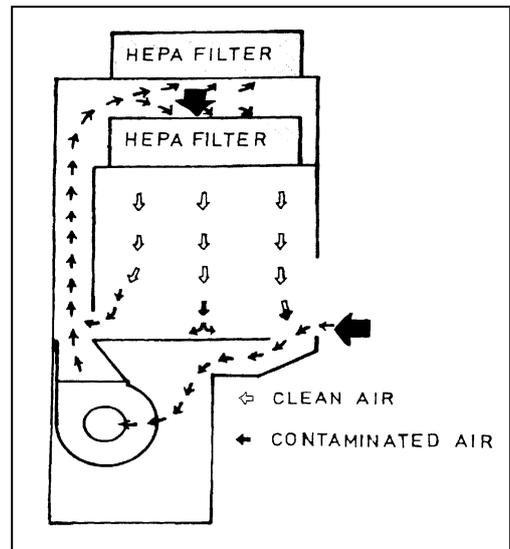
-Classe II, tipo B3: 30% di aria espulsa, 70% riciclata; velocità frontale 0,51 m/s.

Il piano di lavoro in acciaio inossidabile può essere perforato o chiuso.

Il primo tipo è adatto alle operazioni di colture cellulari, perché

mantenendo regolare la laminarità del flusso evita turbolenze responsabili di eventuali contaminazioni incrociate tra zone contaminate e sterili o tra materiali. Il piano chiuso o vassoio è applicabile in microbiologia, dove è più critico il rischio di contaminazione dell'operatore piuttosto che del materiale.

Le strutture sono di solito in acciaio inossidabile verniciato con sostanze anticorrosione; i motoventilatori sono regolabili per il mantenimento automatico delle velocità di flusso. Il vetro frontale può essere apribile, i comandi e gli strumenti di controllo e regolazione sono di solito riuniti sul pannello frontale. Possono essere applicati impianti di illuminazione, lampade germicide e altri servizi.

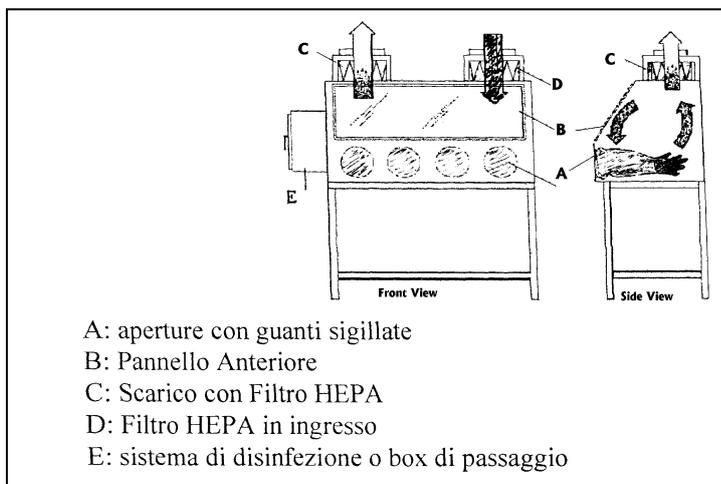


### Cappe biologiche di classe III (glove box)

Questo tipo di cappe rappresentano la forma più completa di difesa. Sul vetro frontale sono montati due manicotti a guanto (glove) per mezzo dei quali si effettuano le manipolazioni in completo isolamento. In queste cappe si effettuano manipolazioni con agenti biologici ad alto rischio ovvero appartenenti al gruppo 4; sono utilizzate anche in caso di manipolazioni che coinvolgano agenti cancerogeni e mutageni. Data la pericolosità dei materiali trattati, sia l'aria introdotta che quella espulsa vengono filtrate in filtri HEPA (a volte in uscita vi è un doppio filtro), mentre l'interno della

cabina viene mantenuto in depressione sotto l'effetto aspirante del motoventilatore posto sopra il filtro.

Il glove box è perciò una cappa tradizionale ad aspirazione diretta, senza flusso laminare e di conseguenza non garantisce la sterilità completa del vano cappa, per l'esistenza di turbolenze interne che possono generare contaminazioni incrociate, pertanto presenta eccellente protezione dell'ambiente e dell'operatore, ma ridotta protezione del



prodotto.

In generale la struttura di base è in acciaio inossidabile con frontale in vetro, su cui sono praticati fori per i passaggi dei guanti.

Le chiusure sono a tenuta. Possono essere costituiti a più posti per lavorazioni in serie o affiancabili, sono predisposti passaggi a tenuta ermetica per sacchi dei rifiuti, per tubazioni, cavi elettrici e per i comandi e la strumentazione di controllo esterni e i sistemi di protezione per il ricambio dei filtri saturi senza contaminazione. I campioni, in contenitori chiusi, sono introdotti tramite sistemi di doppi sportelli.

Queste cappe possono essere costruite anche in PVC opaco o trasparente con il frontale in plexiglas o perspex.

### **Verifiche e manutenzioni**

Nelle cappe progettate per avere un flusso laminare è importante la verifica della laminarità del flusso stesso; una perturbazione del flusso laminare può essere indice di una rottura dei filtri o di una guarnizione di tenuta. Come conseguenza si potrebbero avere delle turbolenze con introduzione o fuoriuscita di aria in ambiente con preclusione della salute dell'operatore. Tale verifica si effettua con l'ausilio di fiammole come quelle utilizzate per le cappe chimiche.

Un indice della corretta funzionalità della cappa biologica è data dalla stima della sua contaminazione interna. Un livello di contaminazione al di sopra dei parametri di qualità per il dispositivo in oggetto può provenire sia da un malfunzionamento del sistema stesso (saturazione o rottura dei filtri, danneggiamento dei sistemi di tenuta ermetica, etc.) oppure da una non idoneità dei sistemi di disinfezione. Pertanto il controllo microbiologico, che si può tradurre sia in un campionamento della superficie di lavoro che dell'aria all'interno della cappa, deve essere preceduto da un accurata pulizia di tutte le superfici interne della cappa stessa. La cappa va poi lasciata in attività, completamente vuota, per 12/24 ore. A questo punto si appoggiano sulla superficie delle piastre per colture cellulari (da scegliersi in base al tipo di inquinamento che si desidera valutare) oppure le stesse piastre possono essere montate su di un impattore che aspira l'aria all'interno della cappa. Dopo idonea incubazione si andrà a valutare sulle piastre l'entità della crescita microbica e la si confronterà con i parametri di qualità per quella cappa.

### **Impianto elettrico ed altri impianti accessori**

Tutti i comandi elettrici e le prese devono essere posizionati all'esterno della cappa al fine di minimizzare i rischi di incendi e/o esplosioni. La soluzione migliore è posizionarli sul montante laterale della cappa, piuttosto che sotto, al fine di evitare che eventuali fuoriuscite di liquido dalla cappa ne compromettano la sicurezza.

Quando i sistemi di illuminazione ed eventuali altri componenti o impianti elettrici vengono posizionati all'interno della cappa, essi dovranno essere realizzati in esecuzione a prova di esplosione (AD-PE) e protetti da interruttore onnipolare all'esterno della cappa stessa. L'impianto elettrico comunque deve rispondere alle classi CEI 31 – 30 e 31 - 33 (impianti elettrici nei luoghi con pericolo di esplosione o incendio) di protezione elettrica non inferiori a IP 55 (protetti dalla polvere e dagli schizzi di acqua). Inoltre deve essere garantita una illuminazione di almeno 800 lux.

Le tubazioni che portano acqua, metano ed altri gas sotto cappa devono essere contraddistinte con i corrispondenti colori. Se le tubazioni sono in numero rilevante è richiesto anche un cartello indicativo del gas erogato.

Le manopole di apertura e chiusura delle erogazioni devono essere accessibili e poste all'esterno della cappa e devono anch'esse essere contraddistinte da colori. Se all'impianto del metano sono collegati dei becchi Bunsen questi devono essere dotati di termocoppia che interrompa l'erogazione del gas in caso di spegnimento della fiamma.

Le cappe di sicurezza biologica inoltre devono essere certificate sia al momento dell'installazione che periodicamente (ogni anno, al cambio dei filtri) ed ogni qual volta vengano reinstallate.

Per le cappe di classe I e II, al fine dell'efficienza, è importante la loro collocazione nel laboratorio in posizione priva di correnti d'aria e lontana dalle aree di transito del personale quindi, per funzionare al meglio, la cappa deve essere collocata:

- isolata dalle altre aree di lavoro
- non in prossimità di zone di passaggio
- lontano dai bocchettoni dell'impianto di ventilazione
- lontano dalla porta di ingresso

Generalmente sul frontale della cappa oltre al pannello di comando è presente un contatore ed alcune cappe possono essere dotate di indicatori visivi e/o sonori per segnalare all'operatore lo stato del filtro. L'efficienza dei filtri HEPA è in relazione al tempo, in ore, di utilizzo della cappa; nonostante ciò sarebbe bene verificare l'intasamento e l'integrità dei filtri almeno due volte l'anno; i filtri intasati o deteriorati saranno sostituiti cercando di ridurre al minimo il rischio di contaminazione per l'operatore. I filtri sostituiti dovranno essere eliminati come rifiuto sanitario a grado di pericolosità e di infettività in relazione agli agenti biologici manipolati in quella cappa.

#### **4.1.2. NORMA TECNICA UNI 12469:2001: CRITERI DI PRESTAZIONE PER LE POSTAZIONI DI SICUREZZA BIOLOGICA**

La norma tecnica, oltre che prevedere la classificazione delle cappe di sicurezza biologica (I, II e III), definisce anche le classi di performance per le cappe di sicurezza biologica.

##### **Tenuta del dispositivo**

La tenuta viene indicata da tre indici di contenimento (LI) che vanno dal peggiore (LI-A) al migliore (LI-C). In tutti i test si valuta l'entità della dispersione di un gruppo di microrganismi in condizioni definite ad eccezione delle LI-A per le quali la dispersione non viene definita. Nel caso delle LI-B la dispersione viene solo valutata mentre nel caso di cappe con LI-C la dispersione oltre ad essere valutata deve essere anche inferiore a valori limite soglia o a limiti di rivelazione.

##### **Pulibilità**

La pulibilità di una cappa di sicurezza biologica (CI) viene anch'essa indicata da 3 indici da CI-A (peggiore) a CI-C (migliore). Le cappe caratterizzate da CI-A in seguito a pulizia presentano ancora sporco visibile oppure non vengono proprio testate per questo criterio. Nelle cappe contraddistinte dall'indice CI-B la pulibilità è stata testata e quantificata in precise condizioni oppure la cappa è stata disegnata con precisi accorgimenti tecnici che tengono conto di quest'aspetto; nelle cappe con indicato l'indice CI-C la pulibilità è stata testata e quantificata in precise condizioni e lo sporco è risultato al di sotto dei limiti di rivelabilità. **Tutte le classi di cappe di sicurezza biologica dovrebbero avere l'indice di pulibilità almeno pari a CI-B o superiore.**

La pulibilità viene applicata come criterio per la definizione della performance di una cappa di sicurezza biologica solo se:

- i depositi di sporco nella cappa possono mettere a rischio la procedura di sterilizzazione se il mezzo di sterilizzazione non raggiunge tutte le parti della cappa o se la temperatura richiesta per la sterilizzazione non viene raggiunta;
- se le procedure di pulizia che sono previste per rimuovere ed inattivare i microrganismi fanno sì che la cappa sia considerata sicura senza introdurre ulteriori procedure di sterilizzazione o inattivazione.

##### **Sterilizzabilità**

La sterilizzabilità di una cappa di sicurezza biologica (SI) viene anch'essa indicata da 3 indici da SI-A (peggiore) a SI-C (migliore). Le cappe SI-A non sono adatte ad essere sterilizzate oppure non sono state sottoposte a test. Le cappe SI-B possono essere trattate per ottenere la riduzione di una specifica carica vitale mentre le cappe SI-C possono essere sterilizzate senza particolari vincoli.

**Tutte le classi di cappe di sicurezza biologica dovrebbero avere l'indice di sterilizzabilità almeno pari a SI-B o superiore.**

In tabella si riassumono i requisiti minimi richiesti per ogni classe di cappa di sicurezza biologica

	Classe I	Classe II	Classe III
Protezione sull'apertura frontale (espressa in $A_{pf}$ – rapporto fra la contaminazione dell'aria misurata sul banco di lavoro e la contaminazione in aria, generata dalla medesima dispersione, misurata all'interno della cappa di sicurezza biologica – oppure in microrganismi dispersi misurati alla postazione dell'operatore e sull'apertura frontale)	$\leq 10$ CFU operatore e $\leq 5$ CFU frontale oppure $A_{pf} \geq 1 \times 10^5$	$\leq 10$ CFU operatore e $\leq 5$ CFU frontale oppure $A_{pf} \geq 1 \times 10^5$	Non applicabile
Tenuta del dispositivo	LI-C per la struttura	LI-C per la struttura	Perdite inferiori al 10% nel test di sovrappressione a 500Pa in tutto il sistema chiuso per 30 minuti
Protezione del prodotto	Non applicabile	$\leq 5$ CFU per test	Non applicabile
Contaminazione crociata	Non applicabile	$\leq 2$ CFU per test	Non applicabile

Le cappe conformi alla UNI 12469 devono essere classificate in accordo con le tre categorie descritte. Le prestazioni delle cappe di sicurezza biologica possono essere determinate e verificate dal costruttore oppure dall'utilizzatore. L'utilizzatore che intendesse effettuare le verifiche deve attenersi alle indicazioni dell'allegato A della UNI 12469 per quanto riguarda caratteristiche costruttive (dimensioni, stabilità, materiali, etc.), illuminazione, vibrazioni, rumore, impianti elettrici, allacciamenti di gas tecnici, ergonomia, temperatura, porta guanti e guanti (classe III) nonché a specifiche altre norme tecniche (p.e. test di tenuta EN 12298, pulibilità EN 12296, sterilizzabilità EN 12297, etc.).

Le metodiche con cui effettuare i test (test di tenuta, dell'efficienza di trattenuta al frontale, tenuta dei filtri HEPA, protezione del prodotto, contaminazione crociata, portata della cappa, geometria dei flussi e velocità dell'aria) sono descritte agli allegati da B ad H.

All'allegato J della UNI 12469 sono riportate le raccomandazioni per la decontaminazione, la pulizia e la fumigazione della cappa di sicurezza biologica e dei filtri HEPA .

In relazione alla procedura di fumigazione si ricorda che è da effettuare solo in caso di reale necessità ovvero:

- prima di qualsiasi manutenzione che richieda l'accesso a parti del dispositivo potenzialmente contaminate (p.e. filtri e pre-filtri nel caso in cui la cappa sia stata utilizzata per la manipolazione di m.o. pericolosi)
- prima di condurre i test di penetrazione sul filtro
- dopo un versamento che potrebbe aver contaminato superfici inaccessibili

ed anche in questi casi deve essere fatta una valutazione rischi/benefici. La fumigazione deve essere condotta da personale esperto che conosca bene le procedure e che segua tutte le precauzioni necessarie. Durante la fumigazione deve essere posizionato sulla cappa un cartello di avvertimento. Nella fumigazione di cappe di sicurezza biologica che reimmettono aria in ambiente è necesasrio assicurarsi che non vi sia esposizione del personale.

### **Manutenzioni periodiche della cappa di sicurezza biologica**

L'allegato K riporta le raccomandazioni per la manutenzione periodica di una cappa di sicurezza biologica. Le cappe di sicurezza biologica di classe I, II e III devono essere sottoposte a verifiche periodiche programmate. Le attrezzature necessarie per tali verifiche devono essere regolarmente calibrate e certificate. La data dell'ultima manutenzione deve essere ben in evidenza sulla cappa.

Di seguito si riportano le verifiche da effettuarsi a seconda della tipologia di cappa.

#### **Cappa di sicurezza biologica di classe I**

- Tutte le superfici interne ed esterne devono essere esaminate visivamente al fine di evidenziare eventuali difetti, rotture o altro.
- Dove possibile, il condotto di estrazione, se presente, deve essere ispezionato per assicurarsi che sia privo di difetti, rotture o altro.
- Gli indicatori di flusso e gli allarmi devono essere verificati, provati e ricalibrati qualora sia previsto dal costruttore.

#### **Cappa di sicurezza biologica di classe II**

- Tutte le superfici interne ed esterne devono essere esaminate visivamente al fine di evidenziare eventuali difetti, rotture o altro.
- Dove possibile, il condotto di estrazione, se presente, deve essere ispezionato per assicurarsi che sia privo di difetti, rotture o altro.
- Gli indicatori degli allarmi devono essere provati in accordo con le indicazioni del fabbricante. Qualora il dispositivo di allarme richieda di essere ricalibrato, il fabbricante deve indicare i tempi di intervento per prevenire i malfunzionamenti dell'allarme qualora ci si trovi al di fuori dei limiti soglia.
- La misura dell'aria di deflusso dalla cappa deve essere misurata in accordo con l'allegato G alla UNI 12469, con le indicazioni del fabbricante e con le tavole H.1
- Il prefiltro deve essere rimontato prima di effettuare la misura del flusso dell'aria.
- Nelle cappe in cui vi sono due filtri esausti, ciascun filtro deve essere testato indipendentemente.

#### **Cappa di sicurezza biologica di classe III**

- Tutte le superfici interne ed esterne devono essere esaminate visivamente al fine di evidenziare eventuali difetti, rotture o altro.
- Il manometro deve essere provato e se necessario ricalibrato secondo le indicazioni del costruttore.
- Dove possibile, il condotto di estrazione, se presente, deve essere ispezionato per assicurarsi che sia privo di difetti, rotture o altro.
- Gli indicatori degli allarmi devono essere provati in accordo con le indicazioni del fabbricante. Qualora il dispositivo di allarme richieda di essere ricalibrato, il fabbricante deve indicare i tempi di intervento per prevenire i malfunzionamenti dell'allarme qualora ci si trovi al di fuori dei limiti soglia.
- L'integrità dei filtri e delle guarnizioni devono essere testati utilizzando il test di penetrazione dell'aerosol d'olio in accordo con l'Allegato D alla UNI 12469 ed i risultati conformi al 7.5. Il flusso dell'aria attraverso le aperture per i guanti deve essere misurato in accordo con l'allegato G e deve essere almeno 0.7 m/s.

- Il flusso dell'aria (portata) attraverso i filtri di iniezione, quando i guanti sono collegato e nella cabina vi è pressione negativa di almeno 200 Pa, deve essere misurata in accordo con l'allegato G e non deve essere inferiore a 3 m<sup>3</sup>/min per ciascun metro cubo di volume della cabina. Il prefiltra deve essere rimontato prima di effettuare la misura del flusso dell'aria.
- La pressione operativa nella cabina deve essere verificata e non deve risultare inferiore a 200 Pa (con riferimento al laboratorio).

### **Misure di sicurezza**

**Chiusura a tenuta:** dovrebbe essere possibile chiudere a tenuta tutte le aperture delle cappe di classe I, II e III per effettuare, per esempio, la fumigazione o la disinfezione. Nelle cappe di classe III devono potersi chiudere a tenuta gli ingressi filtrati in modo che sia possibile effettuare i test di pressione.

**Indicatori di allarme:** le cappe di classe I, II e III devono essere dotati di indicatori di allarme sia visivi che sonori; tali indicatori devono essere ben visibili dalla postazione di lavoro. Gli indicatori di allarme devono attivarsi quando la portata si discosta dai valori specificati dal costruttore. All'attivazione della cappa gli allarmi devono essere attivati fino al raggiungimento della portata corretta. Nella fase di avvio è consentito che non sia attivo l'allarme sonoro. Non deve essere possibile disattivare l'allarme durante il funzionamento della cappa salvo i casi in cui vi siano dei falsi allarmi.

### **Protezione dell'ambiente**

Ciascun dispositivo deve essere costruito in modo che l'aria espulsa dalla cabina sia filtrata attraverso un filtro ad alta efficienza (HEPA) conforme alla EN 13091 oppure di classe H14 o maggiore in conformità alla EN 1822-1.

In alcuni casi è opportuno che l'aria espulsa passi attraverso un doppio filtro HEPA; tali filtri devono essere verificabili singolarmente. Le cappe che espellono l'aria filtrata in ambiente devono essere equipaggiate con un dispositivo che consenta di evacuare i gas risultanti dalla fumigazione.

### **Sistema antiricircolo**

Qualora la cappa sia dotata di espulsione all'esterno è necessario che vi sia un sistema di controllo per evitare fenomeni di rientro nella cappa. Tale funzione deve essere immediatamente verificabile attraverso indicatori visibili.

### **Assemblaggio dei filtri**

I filtri HEPA devono essere conformi alla EN 13091 oppure di classe H14 o maggiore in conformità alla EN 1822-1. Le modalità di installazione dei filtri devono essere intrinsecamente sicure. I filtri devono essere montati in modo che l'aria non possa passare il filtro. I condotti dell'aria che contengono aria contaminata devono essere i più corti possibile ed il filtro principale deve essere collocato il più vicino possibile alla zona di lavoro: in questo modo si ottimizza l'efficacia della disinfezione. Può essere installato un pre-filtro al fine di allungare la durata del filtro principale. La cappa può essere dotata di un oblò sigillabile dal quale verificare la tenuta del filtro, delle guarnizioni, chiusure, etc.

L'installazione dei filtri HEPA deve essere fatta seguendo una procedura validata e le operazioni di installazione devono essere documentate.

### **Cappa di classe III: ventilazione**

La velocità dell'aria attraverso l'alloggio dei guanti, quando un solo guanto è stato smontato, deve essere almeno 0,7 m/s. La quantità di aria che passa attraverso l'ingresso con filtri deve essere almeno 0,05 m<sup>3</sup>/s per ciascun metro cubo

di volume della cabina quando entrambi i guanti sono installati e la pressione negativa della cabina arriva almeno a 200 Pa.

#### **Monitoraggio della pressione nella cappa (classe III)**

Sulla cappa deve essere montato un manometro (-500 a 500 Pa) per avere un riscontro visuale della pressione all'interno della cabina.

Sulla cappa di sicurezza biologica devono essere riportate le seguenti indicazioni:

- classe della cappa di sicurezza biologica
- nome ed indirizzo del fabbricante
- numero e data delle norme tecniche di riferimento
- modello o numero di catalogo e numero di serie
- voltaggio, frequenza della alimentazione elettrica e potenza
- zona di lavoro protetta
- l'anno di costruzione

#### **Documentazione della cappa di sicurezza biologica**

Il fabbricante o il fornitore devono corredare la cappa di sicurezza biologica di un manuale con le procedure operative per il funzionamento ottimale della cappa.

L'utilizzatore deve ottenere una documentazione che attesti le prestazioni del dispositivo e le relative verifiche ovvero:

- un test riconosciuto che comprovi la congruità della cappa alla Norma Tecnica; la certificazione dei filtri HEPA nonché dei sistemi di tenuta dopo l'installazione
- modalità utilizzate per testare la cappa
- manuale operativo e di installazione
- istruzioni per la manutenzione e la sostituzione dei filtri, incluse le modalità per la decontaminazione della cappa, se necessaria;
- diagramma che mostri i flussi di aspirazione interni alla cappa;
- la definizione della zona di lavoro e eventuali zone che non risultano protette
- istruzioni rispetto alle modalità di disinfezione e pulizia della cappa nonché la tipologia di disinfettante utilizzabile
- per le cabine di III classe, diametro del polso e modello dei guanti adatti all'alloggio della cappa.

#### **4.1.3. Esempio di procedura operativa per l'utilizzo della cappa di sicurezza biologica**

- 1) mettere all'interno della cappa tutto il necessario per l'esperimento
- 2) avviare la cappa e lasciarla in funzione per 10 – 15 minuti controllare il flusso con una striscia di carta leggera
- 3) accedere al vano cappa ed eseguire le manipolazioni lentamente, senza bruschi movimenti
- 4) al termine dell'esperimento decontaminare e disinfettare tutto ciò che deve essere estratto dalla cappa
- 5) decontaminare l'interno della cappa
- 6) lasciare funzionare la cappa per 10 – 15 minuti
- 7) spegnere

## **4.2. MATERIALI DI LABORATORIO**

### **4.2.1. Contenitori per campioni**

1. Si devono utilizzare solo contenitori che garantiscano la tenuta ermetica. Nessun residuo deve rimanere sulla parete esterna del contenitore.
2. Ogni contenitore deve essere identificato con etichetta autoadesiva indelebile.
3. Gli eventuali documenti di accompagnamento non devono essere arrotolati attorno al contenitore ma inseriti in un sacchetto a doppia tasca ermetica.
4. Per gli agenti del gruppo 2, 3, 4 si deve prevedere l'applicazione del simbolo di rischio biologico sia sul contenitore che sulla documentazione.

### **Impiego di supporti per provette**

Utilizzare supporti autoclavabili, distinguibili per colore, con bordi arrotondati salvadita, numeri e lettere di identificazione per ciascun foro, infrangibili e con targa per etichetta impermeabile di identificazione.

### **Apertura contenitori dei campioni**

1. Il personale che riceve ed apre i contenitori dei campioni deve essere al corrente del potenziale rischio microbiologico ed essere in grado di operare correttamente in situazioni di emergenza, come ad esempio in caso di rotture.
2. Le confezioni contenenti i campioni vanno ricevute in apposito locale ed aperte su apposito vassoio. I campioni etichettati con il simbolo di pericolo biologico devono essere aperti in cappa di sicurezza biologica.
3. Le superfici di appoggio devono essere mantenute disinfettate con fazzolettini imbibiti di disinfettante.
4. Prima della introduzione nel frigorifero del laboratorio, la parte esterna protettiva del campione deve essere disinfettata con alcool al 70% od altro idoneo disinfettante.

### **Apertura di fiale**

La pressione dell'atmosfera all'interno di una fiala può essere ridotta e di conseguenza, durante l'apertura si può verificare la fuoriuscita di materiale sottoforma di aerosol. Questa operazione deve pertanto avvenire in cabina di sicurezza biologica se si opera con materiale infetto o chimicamente dannoso. Per il prodotto liofilizzato di una fiala operare nel modo seguente:

1. Decontaminare la parte esterna della fiala.
2. Proteggere le mani con cotone o con un panno.
3. Agire sul punto di pre-rottura.
4. Togliere con precauzione la parte superiore della fiala.
5. Aggiungere lentamente il liquido di risospensione evitando la formazione di schiuma.

### **Aerosol (dispersione nell'atmosfera di materiale infetto)**

L'aerosol, una delle maggiori cause di contaminazione ambientale e di infezioni, si può formare:

- nel momento di apertura di provette, pipette e contenitori;
- nell'impiego di agitatori, siringhe, centrifughe;
- nello svuotamento di pipette con soffiaggio;
- nella sterilizzazione di anse o aghi bagnati alla fiamma;
- durante l'apertura di fiale di liofilizzati.

E' pertanto indispensabile evitare per quanto possibile la formazione di aerosol adottando gli appositi mezzi ideati a questo scopo ed attenendosi alle corrette norme di laboratorio per rendere asettico l'ambiente di lavoro.

1. L'ansa metallica usata per striscio deve avere il cerchio completamente chiuso e non deve essere più lunga di 6 cm.
2. Il rischio della diffusione dei microrganismi sul banco di lavoro durante la flambatura dell'ansa è eliminato adottando anse monouso sterili in plastica.
3. Il test della catalasi per microrganismi sospetti di essere agenti biologici di classe 2 non deve essere eseguito su vetrino ma in provetta o con copri-vetrino.
4. I rifiuti vanno riposti in contenitori contenenti busta autoclavabile.
5. Il piano di lavoro deve essere decontaminato con idoneo disinfettante alla fine di ogni periodo di lavoro.

#### **4.2.2. Pipette e pipettatori**

1. L'aspirazione dalle pipette deve avvenire mediante pipettatore. Evitare nel modo più assoluto il pipettaggio con la bocca.
2. Tutte le pipette devono essere dotate di stuello di cotone; in caso di uso di puntali usare puntali muniti di filtro.
3. L'aria non deve essere fatta gorgogliare in liquidi contenenti agenti infetti o potenzialmente infetti.
4. Il liquido non deve essere espulso dalla pipetta con forza.
5. Per evitare la dispersione di materiale infetto accidentalmente caduto da una pipetta, tenere a portata di mano una carta assorbente imbibita di disinfettante.
6. Preferire le pipette a spazio morto in quanto non richiedono la espulsione dell'ultima goccia.
7. Le pipette contaminate devono essere immerse completamente in un disinfettante contenuto in una vaschetta.
8. Il recipiente per la raccolta delle pipette utilizzate deve essere mantenuto all'interno della cabina biologica di sicurezza sino al termine del ciclo di lavoro.
9. Le micropipette devono essere sempre mantenute in posizione verticale, mai adagiate sul banco di lavoro.

#### **4.3. Centrifughe**

##### *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!"), bilanciate accuratamente e poste negli appositi secchielli da centrifugazione muniti di coperchi o in rotor dotati di guarnizioni. L'uso di tali contenitori è necessario perché, qualora avvenga la rottura di una provetta, il materiale infetto rimarrà contenuto nel secchiello che potrà successivamente essere aperto e decontaminato sotto la cappa, evitando in tal modo la contaminazione di tutta la centrifuga. Per una corretta centrifugazione attenersi ai seguenti criteri:

1. prima di centrifugare ispezionare i tubi per la presenza di rotture o fessure;
2. verificare che nel secchiello sia inserito il tipo di adattatore idoneo alle provette in uso;
3. il processo di centrifugazione produce aerosol: riempire e decantare tutte le provette e le bottiglie sotto la cappa.
4. pulire l'esterno delle provette con il disinfettante prima di porle nel rotore;
5. 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;

6. per decontaminare un rotore o un secchiello, immergere il rotore in etanolo al 70%-80% o in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2-3% di Cl attivo per 20 minuti, se non corrosivo per il materiale; immergere il rotore/secchiello in un detergente leggero e quindi risciacquare.

#### *Microcentrifughe*

Le microcentrifughe che possiedono caratteristiche di contenimento con doppio coperchio possono essere impiegate al di fuori della cappa di sicurezza biologica, 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 sicurezza biologica.

#### *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 sicurezza biologica.

### **4.4. Freezer e frigoriferi**

1. Frigoriferi, congelatori e produttori di ghiaccio devono essere sbrinati, puliti e disinfettati periodicamente per garantire il corretto funzionamento e per la eliminazione di eventuali fiale o provette che si possono essere rotte durante la conservazione. L'operatore deve indossare maschera protettiva e guanti di gomma pesante ed isolanti; utilizzare pinze per asportare frammenti di vetro e plastica. Ultimata la pulizia, disinfettare tutte le superfici. Sterilizzare in autoclave il materiale eventualmente raccolto.
2. Tutti i contenitori conservati all'interno del frigorifero/congelatore devono essere chiaramente identificati con apposite etichette che resistono alle basse temperature. Su ogni etichetta deve essere riportato un riferimento relativo al contenuto, alla data, al nome del ricercatore, etc. Utilizzare solo contenitori a tenuta ermetica. Eliminare le chiusure fatte con fogli di alluminio o simili. I prodotti a rischio devono essere conservati in contenitore dotato di chiave e fissato all'interno del frigorifero in modo amovibile. La chiave deve essere fornita ad un solo responsabile.
3. Tutto il materiale obsoleto, scaduto od anonimo deve essere sterilizzato in autoclave ed eliminato.
4. Le soluzioni infiammabili non devono essere conservate in un normale frigorifero ma in una unità a prova di esplosione.
5. è importantissimo assicurarsi che le porte dei freezers siano chiuse ermeticamente. Gli operatori devono segnalare tempestivamente qualsiasi malfunzionamento dei freezers;

### **4.5. 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 con il solo 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.

### **4.6. Bagni termostatici**

1. installare il bagno termostatico lontano da qualsiasi derivazione elettrica sotto tensione (prese, cavi apparecchi);

2. riempire il bagno termostato con acqua distillata, meglio se con l'aggiunta di un antimuffa o di un antimicrobico;
3. sostituire l'acqua almeno una volta alla settimana. Ogni volta che appare sporca o si contamina trattarla come rifiuto infetto, aggiungendo ipoclorito di sodio (2-3% di cloro attivo), e successivamente smaltirla come rifiuto chimico. Periodicamente procedere ad una pulizia approfondita e disinfezione del bagno indossando i guanti;
4. La temperatura e la stagnazione dell'acqua dei bagnomaria favorisce la moltiplicazione di germi e di alghe. All'acqua deve essere pertanto aggiunto un antimicrobico. In questo caso si consiglia di rinnovare l'acqua ogni 4-6 settimane.
5. evitare di immergere nell'acqua le mani nude.

#### 4.7. Omogeneizzatori, sonicatori

L'utilizzo di questi apparecchi può dar luogo a formazioni di schizzi ed aerosol causati dalla 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; non impiegare i tradizionali "frullini tipo cucina" in quanto non garantiscono la tenuta ermetica e possono disperdere aerosol. Impiegare omogeneizzatori tipo "Stomacher".
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 i guanti, una protezione per il viso ed il camice monouso;
6. nel caso dei sonicatori, l'utilizzatore dovrà indossare anche dispositivi individuali per la protezione dell'udito (tappi, cuffie)

#### 4.8. Le autoclavi

Le autoclavi più utilizzate nei laboratori di ricerca sono:

- A) Autoclavi a dislocamento per gravità. Il vapore sottopressione nella camera, sposta verso il basso l'aria più pesante, ed esce attraverso la valvola dello scarico, equipaggiato con filtro HEPA. Queste autoclavi operano generalmente a 121° C.
- B) Autoclavi a prevuoto. Queste macchine permettono la rimozione dell'aria dalla camera prima di immettere il vapore. L'aria viene eliminata attraverso una valvola dotata di filtro HEPA. Alla fine del ciclo, il vapore viene allontanato automaticamente. Queste autoclavi possono operare a 134°C. Sono ideali per materiali porosi, ma non possono essere usate per trattare liquidi o materiali contaminati da prioni a causa della presenza del vuoto.

##### *Carica delle autoclavi*

I materiali devono essere sistemati nella camera ad una certa distanza uno dall'altro in modo da facilitare la penetrazione del vapore e la rimozione dell'aria. I contenitori devono permettere al vapore di entrare in contatto con il contenuto.

Le fasi di lavoro di un ciclo di sterilizzazione di un'autoclave sono generalmente tre:

#### Pretrattamento

Lo scopo del "pretrattamento" è di sostituire tutta l'aria nella camera con vapore saturo, anche negli spazi lasciati all'interno del confezionamento del materiale, così come nelle cavità e nei pori del materiale da sterilizzare. Poiché l'aria ha una densità circa 1,7 volte maggiore del vapore, a parità di condizioni temperatura/pressione, se non viene eliminata completamente stratificherà nelle parti inferiori della camera e dei recipienti vuoti. Ciò impedisce il raggiungimento delle corrette condizioni di sterilizzazione. Se questa sostituzione non è completa le spore batteriche possono rimanere circondate da aria che ne impedisce l'umidificazione. In questo caso anche in presenza del calore sufficiente la spora non umidificata può sopravvivere. Durante la fase di "pretrattamento" la graduale sostituzione dell'aria con il vapore ha luogo tramite le ripetute espulsioni di aria dalla camera e contemporanee sostituzioni della stessa con vapore.

#### Sterilizzazione

Durante questa fase il materiale viene riscaldato dalla T ambiente alla T di sterilizzazione per mezzo del vapore che si condensa su tutte le superfici più fredde della T del vapore. Quando la T e la P impostate vengono raggiunte queste vengono mantenute per un certo periodo di tempo (15 min a 121°C, o almeno 3 min a 134°C). Le pressione e la temperatura di sterilizzazione vengono specificate nei cicli indicati nei manuali di utilizzo in relazione alle caratteristiche dei materiali da sterilizzare ed delle macchine stesse.

#### Post trattamento

Durante questa fase il vapore presente nella camera viene eliminato, si crea il vuoto e tramite il ripristino barico l'aria pulita dall'esterno rientra nella camera attraverso un sistema filtrante; a questo punto inizia il raffreddamento che permette, dopo un certo periodo di tempo, di riaprire l'autoclave.

#### Precauzioni

1. la responsabilità delle operazioni e della manutenzione ordinaria deve essere assegnata a personale addestrato.
2. Il programma della manutenzione preventiva deve includere l'ispezione periodica da parte di personale qualificato della camera, della guarnizione dello sportello, e di tutti gli strumenti di misura e controllo.
3. Il vapore deve essere saturo e privo di agenti chimici che potrebbero contaminare gli oggetti nel corso della sterilizzazione.
4. Tutti i materiali da autoclavare devono essere posti in contenitori che permettano la pronta rimozione dell'aria ed una buona penetrazione del calore; la camera non deve essere troppo riempita, così che il vapore possa arrivare uniformemente al contenuto
5. Usare lenti flussi di estrazione dei vapori quando si autoclavano liquidi, poiché questi a causa del surriscaldamento possono entrare in ebollizione tumultuosa al momento della rimozione
6. Gli operatori devono indossare guanti appropriati e visiere di protezione quando aprono l'autoclave, anche quando la temperatura è scesa sotto gli 80°C
7. In ogni monitoraggio routinario delle prestazioni dell'autoclave, mettere al centro di ciascun carico indicatori biologici o termocoppie. Un regolare monitoraggio con termocoppie e l'abituale registrazione dei dati servono alla definizione dei corretti cicli di funzionamento.

8. Il filtro di scarico della camera (se presente) deve essere rimosso e pulito quotidianamente.
9. Utilizzare solo l'apposita carta da imballaggio per autoclave per confezionare il materiale.
10. Cestelli, cesti, contenitori di vetro devono essere in grado di resistere alle condizioni di temperatura ed umidità senza alterarsi in alcun modo.
11. E' buona norma utilizzare le apposite strisce adesive che indicano l'avvenuta sterilizzazione dell'oggetto.

Le procedure ed il manuale d'uso degli strumenti devono essere collocati nelle vicinanze dell'apparecchiatura e devono risultare di pronta e facile consultazione da parte dell'operatore.

#### **4.9. Incubatori semplici e ad anidride carbonica**

Gli incubatori devono essere sottoposti a trattamento di decontaminazione ad intervalli regolari, attenendosi ad un protocollo riportato in una specifica "Procedura Operativa Standard". L'acquisto dello strumento deve essere orientato verso un modello che prevede il ciclo di decontaminazione alla più alta temperatura possibile (180°C).

#### **PROTOCOLLO DI DECONTAMINAZIONE**

- (a) Svuotare completamente la camera di incubazione da tutto il materiale. Se si è riscontrata una contaminazione, procedere alla autoclavatura di tutto il materiale.
- (b) Svuotare la vaschetta contenente il liquido per la umidificazione della camera.
- (c) Pulire con cura le pareti interne utilizzando un disinfettante non a base di cloro (per non intaccare l'acciaio inossidabile). Asciugare molto bene.
- (d) Chiudere lo sportello ed inserire il comando per dare avvio al ciclo di decontaminazione dell'incubatore.
- (e) Al termine del periodo di decontaminazione (varia da modello a modello), programmare la temperatura di incubazione e, quando questa è stata raggiunta, inserire le piastre, flask, etc.

La superficie esterna di questo materiale dovrebbe essere trattata con un panno sterile per evitare di portare in camera una possibile contaminazione.

#### *Incubazione delle scatole Petri in termostato incubatore*

Ogni incubatore dovrà essere corredato dalla seguente documentazione:

- documento di identificazione in accordo alle norme vigenti
- certificazione CE di sicurezza elettrica
- programma e protocollo di manutenzione ordinaria
- manuale di istruzioni in conformità alle direttive europee

#### *Manutenzione ordinaria periodica dell'incubatore*

Gli incubatori utilizzati per l'incubazione delle scatole Petri devono essere sottoposti a regolare controllo e manutenzione ordinaria periodica. Gli scarti minimi e massimi rispetto alla temperatura impostata dovranno essere compresi entro i limiti fissati dalla metodica seguita dal laboratorio.

#### *Verifica e registrazione temperatura di incubazione*

La soluzione ideale per un monitoraggio continuo della temperatura all'interno della camera di incubazione è rappresentata da un registratore elettronico tempo/temperatura. Non tutti i laboratori sono in grado di affrontare una tale spesa, ma si può ovviare in modo molto più semplice ed economico.

Un termometro a massima e minima è fissato allo sportello interno trasparente dell'incubatore in modo da poter identificare la posizione delle ancorette di massima e minima sulla scala termometrica senza alterare la temperatura della camera.

Nella Procedura Operativa Standard in cui è coinvolto l'incubatore si deve indicare che l'operatore, all'inizio della giornata deve accertare che la variazione di temperatura non sia stata superiore ai limiti fissati (ad es.  $\pm 1^\circ \text{C}$ ). Il valore minimo e massimo viene registrato su modulo.

In caso di "non conformità" si devono indicare nella Procedura Operativa Standard le azioni da intraprendere (ad es.: trasferimento di scatole Petri e provette in altro idoneo incubatore, informazione al Responsabile del Laboratorio sulla non conformità riscontrata, richiesta di intervento al Servizio di Assistenza Tecnica).

#### *Accatastamento scatole Petri nell'incubatore*

Le norme ISO precisano che le scatole Petri all'interno dell'incubatore non devono essere impilate più di 6 e devono trovarsi ad una distanza minima dalle pareti e tra pila e pila non inferiore a 2,5 cm.

Per questo scopo si utilizzano gli appositi cestelli con distanze standardizzate; questi cestelli evitano anche l'accidentale caduta delle scatole Petri durante la movimentazione all'interno del laboratorio, assicurando così l'applicazione della Buona Prassi di Laboratorio in termini di sicurezza biologica per il personale.

*Viene qui di seguito suggerito uno schema di controllo.*

Controllo settimanale

Accertamento semplice rispondenza temperatura con termometro certificato

Controllo mensile

Disinfezione pareti interne

Accertamento rispondenza temperatura con termometro a minima/massima

Controllo semestrale

Accertamento rispondenza temperatura con termometro registratore (ove presente).

#### **4.10. Becchi Bunsen**

Il becco Bunsen è un bruciatore a gas che mediante la fiamma serve a riscaldare rapidamente recipienti e materiali sino a temperature di 700 - 800°C.

1. Occorre usare i Bunsen dotati di termocoppia che fermano l'erogazione del gas in assenza della fiamma. Il becco Bunsen deve essere tenuto pulito, la pulizia sarà effettuata a secco.
2. I tubi per il gas saranno a norma UNI-CIG 7140, di diametro adeguato, fissati saldamente con fascette; periodicamente saranno sostituiti come da scadenza riportata sul tubo.
3. Usando i becchi Bunsen per sterilizzare anse o altri oggetti da microbiologia si possono formare aerosol potenzialmente infettanti; il fenomeno deve essere maggiormente considerato quando si sospetta la possibile presenza di agenti patogeni trasmissibili per via aerea. Tali operazioni andrebbero effettuate sotto cappa di sicurezza biologica.

## 4.11. Gas compressi e liquefatti

### 4.11.1. Gas compressi

I recipienti per gas compressi, liquefatti o disciolti costruiti in un unico pezzo di capacità compresa tra 5 e 150 litri sono denominati BOMBOLE.

Le bombole vanno collaudate e sottoposte a revisione periodica a carico del proprietario: ogni 5 anni per idrogeno e ossido di carbonio, 10 anni per tutti gli altri gas; l'ultima verifica che è riportata tramite punzonatura sul corpo bombola. Il certificato della bombola viene conservato dal proprietario, l'utilizzatore non è tenuto ad averlo nemmeno in copia. E' vietato l'utilizzo di bombole scadute. Un recipiente di gas deve essere messo in uso solo se il suo contenuto risulta chiaramente identificabile. Il contenuto viene identificato nei modi seguenti:

- colorazione dell'ogiva
- la punzonatura del nome commerciale sull'ogiva del recipiente o la dicitura "miscela" accompagnata da etichette o cartellini riportanti la composizione;
- caratteristiche del raccordo filettato.

E' importante quindi che l'utilizzatore non renda illeggibili scritte e non asporti etichette applicate sui recipienti per l'identificazione del gas contenuto. L'unico elemento di sicura identificazione è comunque la punzonatura in quanto i colori potrebbero scolorire o deteriorarsi per invecchiamento.

I rischi generali legati all'utilizzo delle bombole sono riconducibili:

- alla loro poca stabilità
- alla pressione
- all'esposizione ad alte o basse temperature

Data la loro forma sono recipienti instabili e possono provocare danni alle persone e alle cose investite nonché, durante la caduta, riportare danneggiamenti alla valvola: la pressione causata dalla fuoriuscita incontrollata del gas imprime un forte movimento rotatorio alla bombola. In quest'ultimo caso, inoltre, l'ambiente potrebbe saturarsi del gas in questione con pericolo di intossicazione, asfissia etc. E' quindi evidente l'importanza di ancorare sempre le bombole ad un supporto stabile e di proteggere sempre la valvola con il cappello. Le temperature, diverse dalla temperatura ambiente, possono provocare la rottura del recipiente: esposizioni a temperature superiori a 50 °C lo possono fare esplodere per un eccessivo aumento della temperatura interna, temperature molto basse possono invece infragilire l'acciaio di cui sono costituite. Le bombole in lega leggera sopportano temperatura anche inferiori a -20°C. E' quindi necessario porre attenzione sia all'irraggiamento solare che alla vicinanza di fonti di calore. In generale, se il contenuto è infiammabile, è necessario accertarsi che nell'ambiente circostante non siano presenti sorgenti d'innescio.

#### Precauzioni nella movimentazione

Devono essere evitati gli urti violenti e quindi anche utilizzare i recipienti come rulli o supporti. I recipienti devono essere maneggiati solo da persone adeguatamente formate e non devono essere sollevati dal cappello, né trascinati né fatti rotolare o scivolare sul pavimento. Anche per brevi distanze è necessario utilizzare per gli spostamenti un carrello a mano od altro mezzo di sicurezza equivalente.

I recipienti non devono essere sollevati per mezzo di elevatori magnetici né di imbracature con funi o catene. Eventuali sollevamenti a mezzo gru, paranchi o carrelli elevatori devono essere effettuati impiegando esclusivamente apposite gabbie, cestelli metallici o pallets.

È assolutamente vietato usare olio, grasso od altri lubrificanti combustibili sulle valvole dei recipienti contenenti ossigeno e altri gas ossidanti ed anche utilizzare per la movimentazione guanti sporchi, o avere le mani sporche, d'olio o grasso.

#### Precauzioni nel deposito

E' da evitare il deposito nei locali di lavoro in quanto la rottura di una valvola potrebbe mettere in pericolo l'integrità dei piani superiori. In ogni caso è necessario accertarsi che la ventilazione dei locali sia sufficiente ad evacuare eventuali perdite senza provocare danni. I recipienti non devono essere esposti a temperature estreme, ad una umidità eccessiva, né ad agenti chimici corrosivi.

È vietato immagazzinare in uno stesso luogo recipienti contenenti gas tra loro incompatibili (combustibili e comburenti) od anche in luoghi dove si trovino materiali combustibili o sostanze infiammabili.

Nei luoghi di deposito devono essere tenuti separati i recipienti pieni da quelli vuoti, utilizzando adatti cartelli per contraddistinguere i rispettivi depositi di appartenenza.

I recipienti non devono mai essere collocati dove potrebbero diventare parte di un circuito elettrico. Quando un recipiente viene usato in collegamento con una saldatrice elettrica, non deve essere messo a terra per evitare che il recipiente possa essere incendiato dall'arco elettrico.

I locali di stoccaggio devono avere il pavimento pianeggiante ed essere mantenuti sgombri; in loro prossimità devono essere affissi cartelli che riportino i principali rischi e precauzioni.

È vietato lasciare i recipienti vicino a montacarichi, sotto passerelle, o in luoghi dove oggetti pesanti in movimento possano urtarli e provocarne la caduta.

#### Precauzioni nell'impiego

Bombole di gas pericolosi devono essere tenute sotto cappa o in armadi aspirati. La funzionalità dell'impianto di aspirazione va comunque garantita.

E' vietato usare le bombole orizzontali o capovolte. Infatti, nel caso di gas liquefatti o adsorbiti (es. acetilene) la parte liquida potrebbe venire a contatto con la parte interna della valvola e determinare fuoriuscite di grossa entità.

Utilizzare sempre i riduttori di pressione, prima di collegarli controllare che il raccordo sia in buone condizioni e sia esente da sporcizia, olio, dove è prevista accertarsi che sia presente la guarnizione, etc. (p.es. MAI provare se c'è pressione aprendo la bombola direttamente: se è vuota si inquina se è piena può provocare danni).

Evitare di forzare con attrezzi, se la valvola è dura ad aprirsi o è grippata per corrosione, o appaia danneggiata, contattare il fornitore per istruzioni ed evitare di utilizzare il gas.

L'utilizzatore non deve cambiare, manomettere, tappare i dispositivi di sicurezza eventualmente presenti, né in caso di perdite di gas, eseguire riparazioni sui recipienti e sulle valvole.

Una volta assicurato il recipiente si può togliere il cappello di protezione della valvola. Le valvole dei recipienti devono essere sempre tenute chiuse, quando il recipiente è in utilizzo l'apertura della valvola deve avvenire gradualmente e lentamente per non danneggiare il riduttore.

Prima e dopo l'uso si verifichi che il riduttore sia regolato per il minimo flusso.

Se è possibile che, una volta effettuato il collegamento con l'utenza, gas o liquidi rifluiscono all'interno del recipiente (es. per flussi a bassa pressione) è necessario montare una valvola antiritorno sulla linea.

La tenuta del circuito deve essere controllata con acqua saponata, mai con una fiamma.

L'erogazione di grossi flussi di gas potrebbe provocare un brusco calo della temperatura del recipiente compromettendone la resistenza del materiale.

Prima di restituire un recipiente vuoto, l'utilizzatore deve assicurarsi che la valvola sia ben chiusa, quindi avvitare l'eventuale tappo cieco sul bocchello della valvola ed infine rimettere il cappello di protezione.

Si consiglia di lasciare sempre una leggera pressione positiva all'interno del recipiente per evitare che cambiamenti della temperatura ambiente provochino un ingresso d'aria all'apertura della bombola priva di riduttore (es. ricarica).

Non effettuare mai travasi da una bombola all'altra.

Non devono essere montati riduttori di pressione, manometri, manichette od altre apparecchiature previste per un particolare gas o gruppo di gas sui recipienti contenenti gas con proprietà chimiche diverse e incompatibili.

Prima di utilizzare il gas è necessario conoscerne le caratteristiche e le misure da prendere in caso di emergenza.

#### Misure in caso di incidente

##### *Fuoriuscita*

- evacuare l'area
- assicurare la ventilazione
- tentare di arrestare la fuoriuscita
- in caso di gas infiammabili o esplosivi è necessario allontanare le sorgenti di ignizione

##### *Incendio*

- evacuare la zona
- avvertire i VVF al cui arrivo si comunicherà il numero, il contenuto e la dislocazione delle bombole coinvolte
- se possibile allontanare, dopo aver chiuso le valvole, le bombole in prossimità dell'incendio ma non quelle lambite dalle fiamme
- iniziare a raffreddare le bombole che non si possono spostare bagnandole su tutta la superficie da un luogo protetto, fino a che il fuoco non sia estinto e la superficie non resti bagnata per almeno 10 minuti dopo aver cessato l'irrorazione. Le bombole di acetilene devono essere immerse nell'acqua per almeno 24 ore.

Nel caso siano coinvolti gas tossici o corrosivi è necessario inoltre:

- utilizzare gli appositi dispositivi di protezione individuale
- ventilare il locale o portarle all'aria aperta in posizione non pericolosa in luogo recintato e segnalato
- verificare l'assenza di perdite con l'acqua saponata
- avvertire il fornitore

##### *Se la valvola è in fiamme*

- tentare di chiudere le valvole
- lasciare bruciare il gas raffreddando la bombola e la zona circostante con acqua - se il gas infiammabile si miscela all'aria può provocare una esplosione

La fiamma si estingue perciò solo se:

- costituisce particolare pericolo
- la fuoriuscita è minima
- la valvola si può chiudere rapidamente
- la bombola può essere portata rapidamente all'esterno
- non esistono possibili sorgenti di innesco

#### **4.11.2. Liquidi criogenici (Gas liquefatti)**

I pericoli connessi all'utilizzo di gas liquefatti inerti come AZOTO ed ARGON sono legati a due importanti proprietà:

- sono estremamente freddi
- quantità assai piccole di liquido si trasformano in volumi gassosi assai grandi

Questo discorso vale anche per i gas liquefatti tossici, nocivi, infiammabili o esplosivi, ma saranno necessarie altre precauzioni aggiuntive.

#### Come evitare il contatto

Maneggiare sempre i liquidi con la massima cautela. Dal momento che la loro temperatura è estremamente bassa producono sulla cute un effetto simile ad una ustione. Versati su una superficie, tendono a coprirli completamente ed in ogni anfratto. I tessuti altamente sensibili (es. occhi) devono essere particolarmente protetti.

Tenersi sempre a distanza sicura da un liquido che bolle e schizza e dal gas da esso emanato. Ciò avviene sempre quando si riempie un recipiente caldo, oppure quando si inseriscono degli oggetti nel liquido. Eseguire sempre queste operazioni LENTAMENTE per minimizzare ebollizione e schizzi. Evitare sempre il contatto di qualsiasi parte del corpo non protetta con tubazioni o recipienti non isolati contenenti gas atmosferici liquefatti: il metallo estremamente freddo può infatti aderire saldamente alla pelle e lacerarla. Usare delle tenaglie o pinze con manici isolanti per estrarre oggetti immersi nel liquido.

#### Gli indumenti protettivi

Proteggere gli occhi con una visiera od occhiali di protezione (gli occhiali di sicurezza non muniti di ripari laterali non garantiscono una protezione adeguata). Portare sempre dei guanti per maneggiare qualsiasi oggetto che è o possa essere stato in contatto con il liquido. I guanti dovranno calzare in maniera larga in modo che possano essere gettati via rapidamente, qualora si versasse o schizzasse del liquido dentro di essi. Quando si maneggiano dei liquidi in contenitori aperti, per aver cura di non versarli dentro le calzature, indossare sempre i pantaloni all'esterno delle calzature.

#### La ventilazione

Anche piccole quantità di liquido possono sviluppare grandi volumi di gas, per eliminare ogni pericolo di asfissia è necessario maneggiare i gas atmosferici liquefatti in ambienti sempre ben ventilati. Si ricorda che qualora la concentrazione di ossigeno cali sotto il 16% circa, è possibile che una persona perda i sensi senza alcun sintomo premonitore.

Il vapore nebuloso che si sviluppa quando un gas atmosferico liquefatto viene esposto all'aria è costituito da umidità condensata, in quanto il gas stesso è incolore.

#### Le attrezzature

Attenersi sempre alle procedure prescritte dal costruttore per l'impiego e la manutenzione delle attrezzature. Chiunque lavori con questi liquidi dovrà essere opportunamente addestrato. Le attrezzature non devono mai essere manomesse o modificate senza l'intervento di un tecnico esperto.

Usare soltanto contenitori studiati appositamente per contenere gas liquefatti evitando di riempirli troppo velocemente quando la loro temperatura sia troppo elevata. Occorre comunque che tutti i contenitori siano di tipo aperto oppure che siano protetti da uno sfiato od altro dispositivo di sicurezza che permetta lo scarico di gas.

Quando si usa uno speciale tappo distributore a pressione con sfiato, oppure un tubo di sfiato, come nel caso di piccoli contenitori portatili, controllare lo sfiato ad intervalli regolari per accertarsi che non sia ostruito dall'umidità atmosferica ghiacciata.

I grandi recipienti di deposito non aperti devono essere muniti di dispositivi di limitazione della pressione. Utilizzare solo i tappi forniti con i contenitori. Non tappare mai contenitori di piccole dimensioni, bensì coprirli con materiali isolanti (polistirolo, poliuretano, etc.) quando non sono in uso per proteggere lo sfiato dall'umidità.

Riempire i contenitori soltanto con i liquidi che essi sono destinati a contenere.

Usare un imbuto ogniqualvolta si versi gas liquefatto in un vaso di Dewar o altro contenitore di piccole dimensioni.

Quando risulta pericoloso o scomodo inclinare il contenitore, usare un tubo di travaso per estrarre il liquido.

Immergere a fondo il tubo di travaso nel liquido, fino a che il materiale di guarnizione, o il tappo sul tubo di travaso formi una tenuta con il collo del contenitore. L'evaporazione normale produce di solito una pressione adeguata per l'estrazione del liquido.

Se si vuole ottenere una estrazione continua, il contenitore può essere pressurizzato con il gas corrispondente al prodotto liquido, oppure con un altro gas inerte esente da olio. Non usare una pressione più elevata di quanto sia appena sufficiente per l'estrazione del liquido.

Assicurarsi che soltanto il personale autorizzato acceda ai serbatoi di deposito dei liquidi. E' buona norma che tutte le operazioni ai serbatoi siano condotte da almeno due operatori.

Anche se il fornitore è proprietario dei serbatoi, è essenziale che l'utilizzatore abbia una conoscenza perfetta di ogni aspetto dell'impiego di questo impianto, ed in particolare dell'esatta sistemazione delle valvole e degli interruttori da usare qualora occorresse chiudere completamente i serbatoi in caso di emergenza.

#### Norme di pronto soccorso

##### *Ustioni da liquidi freddi*

In caso di contatto con la cute o con gli occhi di uno qualsiasi dei gas liquefatti, bagnare immediatamente la parte del corpo interessata con abbondanti quantità di acqua non riscaldata ed applicare quindi delle compresse fredde. Se sulla cute si formano vesciche o vi sia stato il pericolo di contatti con gli occhi, condurre immediatamente il paziente da un medico per il trattamento del caso.

##### *Asfissia*

Se una persona comincia a vacillare oppure perde i sensi mentre lavora con l'azoto liquido, portarla immediatamente in un luogo ben ventilato. Se si è arrestata la respirazione, praticare la respirazione artificiale. Ogniqualvolta una persona perde i sensi chiamare immediatamente il medico.

La maggior probabilità di un accumulo di azoto avviene quando il locale è chiuso, ad esempio durante la notte. Se sorge un qualsiasi dubbio circa la quantità di ossigeno nel locale, ventilare completamente l'ambiente prima di entrarvi.

#### **4.12. Strumenti automatici di analisi**

Gli strumenti automatici di analisi presentano diversi fattori di rischio; possono avere delle parti meccaniche in movimento che devono essere protette in modo da non provocare danni agli operatori o ai materiali posti nelle vicinanze.

1. Le aree eventualmente interessate dal movimento automatico devono essere chiaramente segnalate.
2. Le parti in tensione delle apparecchiature dovrebbero essere protette da schermi che non vanno mai rimossi, se non è previsto dal costruttore, ed anche in questo caso solo dopo aver sconnesso l'alimentazione elettrica.

3. Particolare attenzione si deve porre nel caso in cui gli apparecchi siano dotati di pipette automatiche per il prelievo e la dispensazione dei campioni o di sistemi centrifughi per la miscelazione dei campioni con i reattivi; in entrambi i casi può generare una dispersione fine di materiale nell'atmosfera circostante che può depositarsi sulle superfici dell'apparecchio.
4. Può essere utile posizionare uno schermo di protezione.
5. Occorre quindi controllare e decontaminare le superfici dell'apparecchio, i portacampioni e l'area di lavoro circostante: indossare per questa operazione i guanti e cambiare con frequenza i mezzi utilizzati per la pulizia (garze e altro).
6. Nel caso in cui i puntali delle pipette non siano monouso, agire per la pulizia e/o sostituzione con estrema cautela per evitare ferite accidentali.
7. Alla fine delle sessioni di lavoro eseguire i cicli di pulizia indicati dal costruttore.
8. I liquidi di scarico, raccolti in appositi contenitori direttamente collegati all'apparecchio, ed i rifiuti solidi, sono da considerarsi materiali potenzialmente pericolosi e devono essere eliminati secondo le procedure stabilite.
9. Gli apparecchi che durante il loro funzionamento possono dar luogo a fumi o aerosol potenzialmente pericolosi (gas cromatografi, analizzatori a fiamma, spettrofotometro ad assorbimento atomico) devono avere un sistema di aspirazione dedicato.
10. Gli apparecchi e gli accessori smontati devono essere decontaminati prima di procedere a qualsiasi intervento di manutenzione e/o riparazione, specialmente se tali interventi saranno eseguiti da personale esterno del laboratorio. Se le caratteristiche costruttive lo permettono le parti smontate potranno essere sterilizzate.
11. Nel caso non sia stato possibile eseguire le operazioni di decontaminazione segnalare in modo visibile il pericolo biologico.

## 5. DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE (DPI) PER IL RISCHIO BIOLOGICO.

Si riassumono nella tabella sottostante i dispositivi da indossare ogni qualvolta che ci si appresti a manipolare agenti biologici oppure si compiano operazioni in cui possono essere potenzialmente presenti agenti patogeni; tali dispositivi sono indicati anche per la protezione dal contatto con agenti ipersensibilizzanti.

DPI e normativa tecnica di riferimento	Alcuni esempi di attività
Guanti protettivi dall'esposizione ad agenti biologici o ipersensibilizzanti (Norma UNI 374/1, 2 e 3). 	Manipolazione campioni biologici umani (fluidi biologici) Manipolazioni di mezzi colturali Manipolazione di animali da esperimento, compresi insetti. Manipolazioni di campioni di origine animale o vegetale. Attività di mantenimento e gestione degli stabulari. Attività in campo.
Schermi facciali (Norma UNI 166)	Manipolazione di materiale biologico in genere con possibilità di proiezione di materiale infetto (aerosol contaminato, mezzi colturali, etc.) in laboratorio, in stabulario ed in campo.
Occhiali con schermi laterali (Norma UNI 166)	Manipolazione di materiale biologico in genere con scarsa possibilità di proiezione di materiale infetto in laboratorio, in stabulario ed in campo.
Facciale filtrante (Marcato CE richiedendo la resistenza alla penetrazione microbiologica)	Manipolazione di materiale biologico in genere con probabile produzione di aerosol infetto o ipersensibilizzante in laboratorio, in stabulario ed in campo.

## 6. DECONTAMINAZIONE, DISINFEZIONE O ASEPSI

### Principali sistemi di disinfezione e loro caratteristiche

I processi di rimozione dello sporco raggiungono diversi gradi di efficienza a seconda del livello di pulizia che si intende ottenere. La disinfezione consiste nella distruzione dei microrganismi patogeni (tranne le spore) e si attua generalmente attraverso sistemi chimici o fisici. Esistono tre diversi livelli di disinfezione con diversi obiettivi di pulizia (vedi tabella):

Microrganismo	Livello di attività dei disinfettanti (operando a condizioni standard – dopo detersione, concentrazione ottimale di impiego, corretto tempo di contatto, assenza di fattori interferenti)		
	Alto	Medio	Basso
Batteri vegetativi	+	+	+
Micobatteri	+	+	-
Endospore batteriche	+	-	-
Funghi	+	+	+/-
Spore fungine	+	+	-
Virus liofili	+	+	+
Virus idrofilo	+	+	-

La sterilizzazione ha come obiettivo l'eliminazione di tutte le forme di vita comprese le spore e si ottiene tramite l'utilizzo di sistemi fisici (autoclave, stufa a secco) o chimici (ossido di etilene).

La decontaminazione ha l'obiettivo di ridurre la quantità di microrganismi a livelli di sicurezza da una superficie e da un oggetto; può essere raggiunta mediante l'impiego di disinfettanti chimici o di mezzi fisici.

La disinfestazione ha come obiettivo la distruzione dei parassiti vettori di malattie infettive.

La disinfezione deve sempre essere preceduta da una buona decontaminazione.

### 6.1. Sterilizzazione e decontaminazione con il calore

Per sterilizzare o decontaminare il calore può essere utilizzato come calore secco o umido.

Il calore secco agisce mediante inattivazione termica (distruzione per ossidazione) ed è di semplice applicazione anche se meno efficace del calore umido; richiede tempi più lunghi e temperature più elevate. Il suo principale utilizzo riguarda i materiali che si alterano con l'umidità e che non sono penetrabili dal calore umido (es. polveri, sostanze insolubili in acqua, recipienti chiusi, etc.); il calore umido agisce mediante coagulazione irreversibile delle proteine microbiche ed è più rapido ed efficace del calore secco.

Calore secco				
Tipo	Principi	Vantaggi	Svantaggi	Applicazioni
Stufa ventilata	160-180°C per 2-4 ore	Penetra nelle sostanze insolubili in acqua (grassi, olii, etc.); danneggia meno dell'autoclave gli strumenti metallici ed affilati;	Diffusione e penetrazione lenta; non adatto è per materiale plastico riutilizzabile	Materiale anidro come grassi, olii, polveri; vetreria di laboratorio; recipienti chiusi
Fiamma	Ossidazione a cenere (combustione)	Rapidità	L'iniziale contatto con la fiamma può produrre un aerosol (vitale); rischio di incendio	Anse ed aghi da batteriologia
Calore umido				
Bollitura	Temperatura max raggiungibile 100°C per 10-30 minuti	Richiede una minima attrezzatura	Non pratico per l'utilizzo quotidiano; non garantisce la distruzione delle spore	Piccola strumentazione
Autoclave	Vapore sotto pressione; 121°C/1 atm per 15-20 min; 134°C/2 atm per 4-15-min	Rapidità; il più sicuro metodo di sterilizzazione in laboratorio	Necessità di manutenzione e controllo di qualità; danneggia materiali termosensibili	Sterilizzazione di materiale riutilizzabile; decontaminazione di rifiuti infetti

La sterilizzazione in autoclave rappresenta la soluzione ideale per la decontaminazione dei rifiuti infetti (colture batteriche, capsule di Petri, materiale solido contaminato come pipette, guanti, flaconi, etc.) e per la sterilizzazione della vetreria e dei terreni colturali. Dal momento che il vapore deve venire a contatto con i microrganismi per distruggerli, particolare attenzione deve essere posta nel sistemare il materiale all'interno dell'autoclave al fine di favorire la penetrazione del vapore. Al fine di verificare l'effettiva temperatura in autoclave, quindi l'effettiva riuscita della sterilizzazione, è indicato l'utilizzo di un indicatore biologico termoresistente (ad esempio spore di *Bacillus Stearothermophilus*) piuttosto che colorimetrico (nastro adesivo) che dovrà essere collocato nell'area meno raggiungibile dal vapore.

## 6.2. Sterilizzazione e decontaminazione con altri mezzi fisici

### Raggi ultravioletti

La luce emessa dalle lampade UV ( $\lambda \approx 260$  nm) ha proprietà germicide e può essere utilizzata per ridurre il numero di microrganismi patogeni su una superficie esposta o nell'aria. I raggi UV hanno però uno scarso potere di penetrazione; la presenza di polvere, sporcizia, grassi può proteggere i microrganismi dalla esposizione diretta necessaria a garantirne l'inattivazione. L'efficienza della decontaminazione può essere inficiata anche da una cattiva manutenzione e pulizia della lampada che andrebbe pulita (dopo isolamento dall'impianto elettrico) con alcool almeno ogni due settimane. Altro controllo indispensabile è la valutazione dell'emissione radioattiva in modo che la lampada venga sostituita qualora si abbia un decremento della radiazione del 70% rispetto all'energia nominale.

### Altri mezzi fisici di sterilizzazione e decontaminazione

- Microonde: utilizzate per il trattamento di liquidi ed oggetti non metallici.
- Raggi gamma: sono dotati di notevole potere di penetrazione pertanto sono indicati per la decontaminazione di materiale già impaccettato (es. siringhe); i raggi gamma sono idonei anche alla disinfezione di materiale sanitario sensibile al calore, alla pressione ed ai disinfettanti chimici.
- Filtrazione su membrana: utilizzata per rimuovere particelle (microrganismi) da fluidi; la grandezza delle particelle da rimuovere è determinata dal diametro dei pori della membrana filtrante.

## 6.3. Sterilizzazione e decontaminazione con disinfettanti chimici

### Efficacia e scelta del tipo di disinfettante

	Batteri (forme vegetative)	Virus lipidici	Bacilli tubercolari	Virus idrofilici	Spore batteriche
Composti ammonio quaternario	+	+	-	-	-
Fenoli	+	+	+	+/-	-
Der. del cloro	+	+	+	+	+/-
Iodofori	+	+	+	+/-	-
Alcool	+	+	+	+/-	-
Glutaraldeide	+	+	+	+	+
Perossido d'idrogeno	+	+	+	+	+

+ = efficace; +/- = efficace a condizioni ben definite; - = inefficace

Il sistema di disinfezione deve essere un procedimento di riconosciuta efficacia da scegliersi in base a numerosi fattori tutti determinanti per la buona riuscita della disinfezione stessa. I fattori da considerare sono:

- Livello di disinfezione richiesto (alto, medio, basso)
- Tipo di microrganismo: la resistenza ai disinfettanti varia in base al tipo di microrganismo (vedi tabella sopra) in particolare in ordine crescente di resistenza troviamo:
  - forme vegetative dei batteri (es. *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*)
  - virus con rivestimento lipidico (es. HIV, HBV, Herpes simplex, Cytomegalovirus)
  - funghi (es. *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Candida*)
  - virus privi di rivestimento lipidico (es: Poliovirus, Coxsackievirus, Rhinovirus)
  - micobatteri (es: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*)
  - spore batteriche (*Clostridium*)
- Numero di microrganismi: il grado di contaminazione influenza il tempo di disinfezione ovvero maggiore è la contaminazione maggiore dovrà essere il tempo di contatto necessario per inattivare la maggior parte dei microrganismi.
- Presenza di materiale organico (contenuto in proteine) e la sporcizia: il materiale organico (sangue, feci, tessuti, etc.) inattiva la maggior parte dei disinfettanti chimici pertanto è necessario, prima di procedere alla decontaminazione di un oggetto o di una superficie, provvedere alla rimozione dello sporco o del materiale organico.
- Tipo di materiale da disinfettare: vanno considerate sia le eventuali incompatibilità (azione corrosiva di alcuni disinfettanti) che la presenza di fessure, pori o asperità tali da proteggere il microrganismo e quindi rallentare il processo di disinfezione.
- Tipo di disinfettante: i disinfettanti hanno diversi meccanismi di azione associati a diversi livelli di azione germicida.
- Concentrazione di utilizzo: ogni disinfettante ha una concentrazione ottimale di azione; è inoltre importante ricordare che le soluzioni d'uso non possono essere conservate per tempi lunghi ma vanno possibilmente preparate prima dell'utilizzo.
- Tempi di contatto: è necessario che il tempo di contatto sia sufficiente per l'espletamento dell'azione germicida; va sottolineato che il tempo di contatto è direttamente proporzionale all'entità della contaminazione.
- Temperatura d'uso: in genere ad un aumento della temperatura di utilizzo del disinfettante si accompagna un aumento dell'efficacia facendo però attenzione al fatto che temperature troppo alte possono determinare inattivazioni o sviluppo di vapori tossici.
- Altri fattori che determinano la scelta del sistema di disinfezione: pH della soluzione, durezza dell'acqua, stato di aggregazione dei microrganismi, tossicità a carico degli operatori ed il costo.

In sostanza quindi il disinfettante ideale dovrebbe avere un ampio spettro microbico, un'azione rapida ed una lunga emivita; dovrebbe essere economico, di facile uso ed eliminazione, difficilmente inattivabile, privo di tossicità per l'utilizzatore e non corrosivo. Un tale tipo di disinfettante non esiste pertanto occorre scegliere un compromesso fra le diverse alternative possibili.

**Principali disinfettanti chimici****a) Disinfettanti alogeni: caratteristiche ed applicazioni**

Tipo	Concentrazione efficace e tempi di contatto	Vantaggi	Svantaggi	Livello di attività ed applicazioni
<b>Derivati del Cloro</b>				
Soluzione di ipoclorito di sodio (varechina)	<ul style="list-style-type: none"> <li>100 – 10000 ppm cloro libero per 10 – 60 min.</li> <li>≥ 3000 ppm (ampio spettro)</li> <li>10000 ppm (distruzione HBV)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ampio spettro: attiva contro forme vegetative dei batteri, funghi, la maggior parte dei virus (2-500 ppm) e anche contro le spore (2500 ppm);</li> <li>economica;</li> <li>facilmente reperibile.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tossica, corrosiva per cute e metalli;</li> <li>instabile a pH 6 (livello efficace);</li> <li>inattivata da materiale organico;</li> <li>si deteriora alla luce ed al calore;</li> <li>perde gradualmente l'efficacia (necessità di preparazione quotidiana delle soluzioni d'uso).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Livello di attività intermedio</li> <li>Disinfettante per uso generale: reflui liquidi, decontaminazione delle superfici, decontaminazione di spargimenti di materiale infetto, disinfezione di strumenti ed apparecchiature.</li> </ul>
<b>Derivati dello Iodio</b>				
Iodofori	30-1000 ppm iodio libero	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ampio spettro: Gram +, Gram – e micobatteri;</li> <li>germicida in un ampio range di pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Non garantisce la distruzione delle spore;</li> <li>efficacia ridotta dal materiale organico (meno degli ipocloriti)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Livello di attività: intermedio;</li> <li>utilizzo nei saponi antisettici e germicidi, per la decontaminazione delle superfici e per la decontaminazione degli strumenti.</li> </ul>

**b) Disinfettanti non alogeni: caratteristiche ed applicazioni**

Tipo	Concentrazione efficace e tempi di contatto	Vantaggi	Svantaggi	Livello di attività ed applicazioni
<b>Alcoli</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Etanolo 70-80%</li> <li>Isopropanolo 60-95%</li> <li>10-30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bassa tossicità;</li> <li>rapidità di azione (soprattutto sulle forme vegetative dei batteri e sui virus con rivestimento lipidico)</li> <li>non lascia residuo;</li> <li>non corrosivo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La rapida evaporazione limita il tempo di contatto</li> <li>Infiammabile</li> <li>Irritante per gli occhi</li> <li>Può danneggiare gomma o plastica</li> <li>Inefficace contro le spore.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Livello di attività: intermedio;</li> <li>antisettico per la cute</li> <li>decontaminante per le superfici e le cappe di sicurezza biologica</li> </ul>
<b>Fenoli</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>400-50000 ppm</li> <li>10-30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efficace contro i micobatteri ed i virus lipidici</li> <li>Resistente al materiale organico e all'acqua dura;</li> <li>lascia un residuo attivo;</li> <li>biodegradabile.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Odore pungente</li> <li>Corrosivo</li> <li>Tossico (necessità di DPI)</li> <li>Non ha azione sporidica</li> <li>Limitata azione contro i virus non lipidici</li> <li>Residuo attivo</li> <li>Può permettere la crescita di batteri</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Livello di attività: intermedio;</li> <li>Disinfezione di strumenti, attrezzature, pavimenti ed altre superfici</li> <li>Utilizzato in saponi e lozioni antisettiche.</li> </ul>

Tipo	Concentrazione efficace e tempi di contatto	Vantaggi	Svantaggi	Livello di attività ed applicazioni
<b>Composti dell'ammonio quaternario</b>	500-15000 ppm 10-30 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficace contro i Gram +, i funghi e virus lipidici;</li> <li>• Azione detergente</li> <li>• Stabili</li> <li>• A concentrazioni basse sono batteriostatici</li> <li>• Le soluzioni d'uso hanno bassa tossicità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anche a concentrazioni elevate non sono attivi contro virus privi di rivestimento lipidico</li> <li>• Micobatteri e spore</li> <li>• Possono permettere la crescita di alcuni batteri (<i>Pseudomonas</i>)</li> <li>• Neutralizzati dai saponi e da detergenti anionici</li> <li>• Inattivati dal materiale organico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Livello di attività: basso</li> <li>• Decontaminazione di superfici (pavimenti, pareti, etc.) ed attrezzature</li> <li>• Utilizzato in formulazioni antisettiche</li> </ul>
<b>Perossido di idrogeno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soluzione acquosa 3-30% per 10-60 min</li> <li>• Soluzione acquosa 6% per 30 min può distruggere le spore</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapida azione</li> <li>• Non lascia residui</li> <li>• Bassa tossicità</li> <li>• Sicuro per l'ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azione sporicida limitata</li> <li>• Corrosivo per alcuni metalli</li> <li>• Potenzialmente esplosivo ad alte concentrazioni</li> <li>• Soluzioni concentrate irritano la cute e gli occhi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Livello di attività: alto</li> <li>• Decontaminazione delle superfici, attrezzature e strumenti.</li> </ul>
<b>Ossido di etilene (vapori)</b>	50-1200 mg/L per 1-12 ore	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampio spettro</li> <li>• Non richiede calore elevato</li> <li>• Penetra nel materiale di confezionamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiammabile</li> <li>• Cancerogenicità e mutagenicità potenziale</li> <li>• Il materiale sterilizzato può richiedere anche 24 ore per l'eliminazione dei residui</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Livello di attività: alto</li> <li>• Ideale per materiale, strumentazione ed attrezzature sensibili al calore ed all'umidità</li> </ul>

**c) Disinfettanti del gruppo delle aldeidi: caratteristiche ed applicazioni**

Tipo	Concentrazione efficace e tempi di contatto	Vantaggi	Svantaggi	Livello di attività ed applicazioni
<b>Glutaraldeide</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soluzione acquosa alcalina 0.5-2.5% per 2-30 min (fino a 12 ore per un effetto sporicida)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampio spettro</li> <li>• Non corrosivo</li> <li>• Può resistere al materiale organico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costo elevato</li> <li>• Azione in funzione del pH e della temperatura</li> <li>• Odore pungente</li> <li>• Tossicità per cute ed occhi</li> <li>• Irritante per le vie respiratorie</li> <li>• Emivita della soluzione attivata inferiore a 2 settimane</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Livello di attività: alto</li> <li>• Disinfezione spinta</li> <li>• Decontaminazioni di superfici, strumenti, attrezzature e vetreria</li> </ul>
<b>Formalina (formaldeide al 37% in soluzione acquosa)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3-27% di formalina in sol. Alcolica al 70-90% per 10-30 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampio spettro</li> <li>• Non corrosivo</li> <li>• Può resistere al materiale organico</li> <li>• economica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odore pungente</li> <li>• Tossicità per cute ed occhi</li> <li>• Irritante per le vie respiratorie</li> <li>• Potenziale cancerogenicità</li> <li>• Può impiegare oltre 24 ore per un azione sporicida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Livello di attività: alto</li> <li>• Disinfezione spinta</li> <li>• Decontaminazioni di superfici, strumenti, attrezzature</li> </ul>

#### **6.4. Principali procedure di decontaminazione e disinfezione**

E' importante che il personale di laboratorio conosca ed applichi idonei protocolli di disinfezione. Per casi specifici sono state redatte delle procedure operative o delle linee guida per la manipolazione di particolari agenti biologici: DM 28/09/1990 "Norme di protezione dal contagio professionale di HIV nelle strutture sanitarie ed assistenziali pubbliche e private", DM 29/09/2000 "Misure igieniche di protezione contro le encefalopatie spongiformi trasmissibili", Linee guida sulle norme di sicurezza da adottare per la manipolazione di materiale potenzialmente infetto da agenti non convenzionali nelle pratiche di laboratorio e nelle operazioni di prelievo (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Servizio di Prevenzione e Protezione – Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali).

##### **Decontaminazione e disinfezione delle superfici di lavoro e degli oggetti**

Per la vetreria, dove non fosse possibile l'utilizzo di materiale usa e getta, è indispensabile ricorrere alla disinfezione in autoclave. Si dovrà aver cura inoltre di acquistare attrezzature (centrifughe, strumenti, etc.) facilmente decontaminabili. Fra i disinfettanti di riconosciuta efficacia e di più largo utilizzo ricordiamo:

-glutaraldeide al 2% attivata indicata per materiale da laboratorio, plastica, gomma e metallo; è attivo sulle spore a temperature superiori ai 20°C. Non va utilizzata su superfici e piani di lavoro; è tossica per cute e mucose pertanto il suo utilizzo richiede che si indossino guanti ed occhiali protettivi.

-derivati fenolici (es. o-fenilfenolo) utilizzati come disinfettanti per pavimenti e superfici, non adatti per plastiche, gomme e siliconi sui quali vengono assorbiti. Sono irritanti per cute e mucose quindi richiedono l'utilizzo di guanti ed occhiali protettivi.

-clorammina T, ipoclorito di sodio (candeggina) sono i disinfettanti di prima scelta per superfici contaminate o sporche di sangue; sono consigliate concentrazioni di 5000-10000 ppm. Sono prodotti tossici pertanto sono da applicare indossando guanti e occhiali protettivi.

Le superfici di lavoro devono essere decontaminate almeno due volte al giorno: prima di iniziare il lavoro ed al termine della giornata. Le superfici verticali vanno disinfettate almeno una volta al mese.

Nei laboratori che utilizzano agenti biologici a basso rischio (classe 1 e 2) può essere impiegata una soluzione di composti dell'ammonio quaternario o una soluzione al 70-80% di alcool etilico.

Nei laboratori a più alto rischio (agenti biologici di classe 3), anche se i microrganismi devono essere manipolati solo sotto cappa di sicurezza, è opportuno decontaminare le superfici dei banchi con composti fenolici o derivati dello iodio seguita da un'applicazione di alcool al 70-80% per rimuovere i residui del primo disinfettante. La prima soluzione va applicata con un panno (monouso e di carta) imbevuto (utilizzare i guanti); dopo 5 minuti di contatto si procede alla pulizia finale con un panno nuovo imbevuto di alcool. Il materiale utilizzato per la pulizia va eliminato nei contenitori dei rifiuti biologici.

##### **Decontaminazione e disinfezione dei pavimenti**

I derivati del fenolo ed i composti dell'ammonio quaternario sono i principali disinfettanti indicati per la decontaminazione dei pavimenti. Il metodo raccomandato per la decontaminazione dei pavimenti è quello che utilizza due secchi: uno contenente la soluzione "pulita" di disinfettante, da applicarsi sul pavimento, e l'altro per la soluzione "sporca" raccolta da terra. Lo straccio imbevuto di disinfettante viene leggermente strizzato nel secchio "sporco" ed

applicato sul pavimento; dopo un tempo di contatto di almeno 5 minuti, la soluzione viene rimossa ed eliminata nel secchio "sporco". È necessario utilizzare ogni giorno uno straccio pulito; dopo l'uso lo straccio deve essere immerso in una soluzione pulita di disinfettante per almeno 30 minuti oppure autoclavato.

### **Decontaminazione e disinfezione della cappa di sicurezza biologica**

Come ogni altra superficie la cappa biologica deve essere decontaminata all'inizio ed al termine di ogni giornata di lavoro; sottolineando che la lampada UV presente nelle cappe biologiche non è sufficiente per la decontaminazione efficiente della cappa stessa, sarà necessario provvedere anche ad una disinfezione chimica. Prima di iniziare ad utilizzare la cappa e dopo aver acceso il motoventilatore per 5 – 10 minuti, occorre decontaminare le superfici della cappa con una soluzione di alcool etilico 70-80%; se nella cappa sono stati manipolati agenti a moderato rischio o c'è la possibilità della presenza di virus dell'epatite B, è opportuno utilizzare prima una soluzione di iodofornio al 2% seguita dall'applicazione dell'alcool per rimuovere lo iodio. Al termine dell'attività lavorativa e prima di spegnere il motoventilatore occorre ripetere l'operazione di disinfezione.

### **Procedure di decontaminazione e di disinfezione in caso di spargimento di materiale contaminato**

Si dovranno prevedere procedure operative straordinarie da adottare nel caso di incidente.

La caduta accidentale di provette, flaconi, matracci con conseguente versamento del materiale contenuto è uno degli imprevisti più frequenti in laboratorio pertanto è indispensabile progettare degli interventi di bonifica che dovranno essere differenziati a seconda dei livelli di biosicurezza del laboratorio stesso.

In caso di versamento il personale deve immediatamente lasciare il luogo contaminato ed avvisare immediatamente il responsabile della ricerca. In seguito è necessario togliere immediatamente gli indumenti protettivi e lavarsi la cute esposta utilizzando un disinfettante idoneo al tipo di esposizione e rispettando i tempi di contatto consigliati.

Nel caso il microrganismo sia di classe 1 è necessario adottare quelle che sono considerate le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL). Nel caso di contaminazione da agente biologico di classe 2 la procedura di pulizia dovrà essere un po' più attenta. Se il versamento è su di una superficie (banco di lavoro, pavimento, etc.) allora è necessario isolare il laboratorio ed aspettare circa 30 minuti prima di entrare (tempo necessario per la deposizione dell'aerosol formatosi). Dopo aver indossato gli indumenti protettivi si coprirà l'area contaminata con carta assorbente e vi si verserà sopra una soluzione concentrata di disinfettante e si lascia agire per 20 minuti (ad esempio ipoclorito di sodio). Si dovranno raccogliere i frammenti eventualmente caduti, si asciugherà l'area contaminata che andrà poi spruzzata di nuovo con il disinfettante. Nel caso che il campione versato sia costituito da sangue o da altro fluido biologico è necessario rimuovere bene ogni traccia di materiale organico prima di procedere alla vera propria approfondita disinfezione.

Gli agenti biologici di classe 3, ed a maggior ragione quelli di classe 4, devono essere utilizzati in sistemi chiusi e dotati di contenimenti che impediscano la formazione di aerosol; le procedure di decontaminazione pertanto andranno adottate nei casi in cui i sistemi di protezione previsti non dovessero funzionare. In questi casi dovrà essere ripetuta la procedura adottata per la classe 2 ripetendo le operazioni di decontaminazione due volte.

Tutto il materiale utilizzato per le operazioni di decontaminazione sarà assimilato ai rifiuti biologici nel caso di materiale usa e getta oppure sarà sterilizzato in autoclave in caso di materiale riutilizzabile.

Per far fronte rapidamente alle situazioni di emergenza è utile preparare un "kit di decontaminazione" che dovrà contenere:

- ipoclorito di sodio concentrato
- bottiglia spray da riempire con la diluizione del disinfettante
- pinze e/o palette usa e getta
- carta assorbente
- sacchi "biohazard" per autoclave
- guanti monouso
- dispositivi di protezione per il viso

#### **6.4.1. ESEMPI DI PROCEDURE DI EMERGENZA**

##### **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. Staccare l'interruttore centrale elettrico
6. Avvisare tutti coloro che lavorano nel laboratorio anche se non sono al momento presenti (si sono allontanati per brevi istanti)
7. Predisporre un cartello da affiggere al di fuori del locale (divieto di entrata : incidente chimico/biologico)
8. Se del caso, la persona incaricata di attivare le procedure per il contenimento dell'incidente, munitasi dei DPI necessari mette in pratica la procedura scritta precedentemente per l'inertizzazione dell'evento
  - a. per incidente chimico disporre sul liquido la schiuma o la segatura e solo dopo avere atteso il tempo necessario (definito) raccogliere e smaltire come rifiuto tossico e nocivo (controllare le SDS nella stesura della procedura)
  - b. per incidente biologico attendere 20 minuti e, dopo aver indossato i DPI, mettere in atto la procedura, smaltire come rifiuto biologico
9. affiggere le procedure in luogo ove sia visibile e comunicarla a tutti i frequentatori del locale
10. eseguire una prova all'atto della 1 compilazione e ripeterla ogniqualvolta sia immesso un nuovo procedimento nel locale laboratorio
11. la prova da eseguire dovrà comprendere anche la individuazione della propria via di fuga attraverso i percorsi di emergenza (seguire i cartelli)
12. tutte le procedure devono essere comunicate al Direttore del Dipartimento/Centro/Servizio che ne curerà la raccolta e ne terrà copia da esibire in caso di controllo interno od esterno (ASL ecc.)

##### **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 in accordo con le procedure di disinfezione vigenti in laboratorio. 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.

Porre guanti e mascherina in un sacchetto termoresistente e sterilizzare in autoclave.

#### **MISURE DI EMERGENZA A SEGUITO DI INCIDENTE NEL TRASPORTO CAMPIONI**

Informare il responsabile del laboratorio.

Isolare temporaneamente l'imballo.

Se non si conosce il patogeno trasportato occorre identificarlo.

Distruggere o autoclavare l'imballo e il contenuto.

Se l'agente biologico appartiene al gruppo 2 (o superiori) le persone esposte devono essere tenute sotto controllo medico.

#### **INCIDENTI NEL LABORATORIO BSL 3**

Deve essere presente nel laboratorio BSL3 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 al 2-3% di Cl attivo
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

Per evitare di inalare aerosol, lasciare la stanza. Avvertire dell'incidente le altre persone presenti ed il responsabile del laboratorio e chiudere la porta;

1. rimuovere gli indumenti contaminati, ed eliminarli. Lavare la cute se esposta poi applicare un antisettico. In caso di schizzi nell'occhio procedere al lavaggio degli occhi per 15 minuti.
2. Uscire dall'area BSL3
3. Avisare il responsabile dell'area BSL3 ed attivare la procedura prevista per incidenti occupazionali rivolgendosi al Servizio di Malattie Infettive del pronto soccorso più vicino
4. Non entrare nell'area BSL3 per almeno 1 ora in modo da permettere l'abbattimento dell'aerosol da parte del sistema di ricircolazione dell'aria
5. Gli incaricati di intervenire in caso di emergenza, previa adeguata vestizione, devono rientrare nell'area BSL3, ricoprire con carta l'area contaminata e inondarla con ipoclorito di sodio (a 2-3% di cloro attivo);
6. se si tratta di pareti verticali porre la carta assorbente alla base della parete e spruzzare la parete stessa con l'ipoclorito
7. Uscire dalla BSL3

8. Lasciare agire l'ipoclorito di sodio 1 ora
9. Gli addetti alle emergenze possono rientrare nella BSL3
10. Raccogliere la carta assorbente impregnata di ipoclorito ed eliminarla come rifiuto chimico solido.
11. Fumigare con formalina al 10% la stanza (400 ml, 2 ore di evaporazione) e/o le cappe (80 ml, 30 minuti di evaporazione) e lasciare agire i vapori per almeno 8 ore a flusso spento, premendo il bottone rosso sul pannello elettrico. Terminata la fumigazione il sistema di ricircolazione dell'aria si rimetterà in moto automaticamente.
12. Usare l'area BSL3 dopo 12 ore di ricircolazione dell'aria.
13. 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;
14. Proseguire con le procedure di pulizia.

#### **Versamento di materiale all'interno di cappe di sicurezza biologica**

1. Mantenere la cappa in funzione;
2. Spruzzare o pulire con della carta imbevuta di disinfettante di riconosciuta efficacia (vedere procedure interne);
3. Coprire la superficie di lavoro con il disinfettante adeguato 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 e le griglie, se sono in acciaio.

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.

#### **VERSAMENTI ACCIDENTALI DI MATERIALE INFETTO DA PRIONI**

##### **In caso di contaminazione di superfici:**

- Procedere versando direttamente sulla superficie di lavoro il prodotto disinfettante (ipoclorito di sodio 2-3% di Cl attivo o soda caustica 1N) distribuendo con carta assorbente il disinfettante su tutta la superficie e lasciando agire almeno 1 ora;
- Confinare la zona per il tempo necessario a garantire l'effetto del disinfettante;
- Eliminare la carta assorbente come rifiuto chimico solido.
- Verificare sempre che le operazioni di bonifica siano eseguite nella maniera più corretta possibile e che coinvolgano tutta l'area interessata compresi gli eventuali schizzi;
- Procedere alla detersione.

##### **In caso di contaminazione di mani o parti del corpo**

Allontanare immediatamente eventuali indumenti sia da lavoro che personali impregnati e lasciarli nella zona;

Lavare accuratamente la parte facendosi eventualmente aiutare da colleghi dotati di indumenti protettivi e procedere alla disinfezione con ipoclorito di sodio al 2-3% di Cl attivo.

Smaltire gli indumenti contaminati in appositi sacchetti impermeabili che dovranno essere sigillati prima dell'uscita dal locale e mandati all'incenerimento

Nel caso di incidenti che coinvolgano l'operatore, segnalare immediatamente l'accaduto al Medico Competente ed eventualmente recarsi al Pronto Soccorso. All'interno del laboratorio dovrebbe essere previsto un registro dei lavoratori esposti all'agente patogeno.

## 6.5. DISINFEZIONE (ASEPSI) DELLA CUTE E DELLE MUCOSE

In caso di contaminazione della cute o delle mucose o di ferita accidentale l'operatore deve essere edotto sui tipi di disinfettanti da utilizzare; per piccole ferite è bene utilizzare soluzione acquose a basse concentrazioni di composti dello iodio e iodofori (paniodine, betadine, etc.) mentre per ustioni o ferite più estese è indicato l'utilizzo di amuchina 5% o clorexidina 4%. Per la disinfezione della cute integra risultano efficaci l'alcool etilico al 70%, la clorexidina e lo iodio e iodofori in soluzione detergente. L'associazione di alcuni di questi prodotti ne aumenta l'efficacia (es: alcool etilico associato a clorexidina, a iodio e suoi derivati o a sali di ammonio quaternario). Nella tabella di seguito si riportano rispettivamente "Le principali vie di infezioni ed i sistemi di protezione per l'operatore da adottare durante la manipolazione di agenti biologici" e "Le principali misure di intervento da adottare in caso di incidente".

Vue di penetrazione dell'agente infettivo	Esempi di agenti biologici (classe di rischio)	Protezione dell'operatore
<b>Bocca (ingestione)</b>	Salmonella (2), Shigella (2), Clostridium difficile (2), Virus epatite A (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>è vietato aspirare dalla pipetta con la bocca</li> <li>è vietato mangiare e fumare in laboratorio</li> <li>evitare di portare alla bocca qualsiasi oggetto utilizzato nel laboratorio</li> </ul>
<b>Narici (inalazione)</b>	Mycobacterium tuberculosis (3), Legionella Pneumophila (2), Brucella (3), Virus respiratorio sinciziale 2, Cytomegalovirus (2), Streptococcus pneumonite (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>evitare di sorvegliare operazioni critiche come la semina ed l'apertura delle piastre e delle provette, la centrifugazione, l'omogenizzazione senza indossare i DPI (dispositivi di protezione individuale)</li> </ul>
<b>Pelle (iniezione oppure contatto)</b>	Virus Epatite B (3**) e C (3**), HIV (3**) Herpes Simplex (2), Candida Albicans (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>maneggiare con molta attenzione aghi, pipette Pasteur, vetreria rotta</li> <li>proteggere accuratamente tagli, ferite o abrasioni presenti sulla pelle</li> </ul>
<b>Occhi (schizzi)</b>	Herpes simplex (2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>proteggere sempre gli occhi</li> <li>non utilizzare lenti a contatto</li> </ul>

TIPO DI INCIDENTE	PROCEDURA
<b>Puntura o taglio</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Aumentare il sanguinamento della lesione</li> <li>Detergere con acqua e sapone neutro</li> <li>Disinfettare la ferita con amuchina o prodotto a base di iodio (paniodine)</li> </ol>
<b>Contatto con mucosa orale</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Lavare con acqua il viso e la bocca</li> <li>Risciacquare la bocca con acqua e amuchina</li> </ol>
<b>Contatto con la congiuntiva</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Lavare il viso con acqua</li> <li>Risciacquare la congiuntiva con abbondante acqua</li> </ol>
<b>Contatto cutaneo</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Lavare la zona con acqua e sapone</li> <li>Disinfettare la cute con amuchina o prodotto a base di iodio (paniodine)</li> </ol>

## **7. TRASPORTO E SPEDIZIONE DI MATERIALE BIOLOGICI DEPERIBILI E/O POTENZIALMENTE INFETTI (Circolare n. 3 dell'8 maggio 2003)**

La manipolazione, il trasporto e la spedizione di campioni diagnostici o di sostanze infette imballate in modo improprio comportano un potenziale rischio di infezione non solo per il personale direttamente interessato ma anche per il personale amministrativo ed ausiliario, per gli addetti ai servizi di trasporto e per la popolazione in generale pertanto i recipienti destinati a contenere campioni biologici o sostanze infette devono essere a tenuta stagna; dopo la chiusura, di tipo ermetico, non devono rimanere all'esterno tracce del contenuto.

### **Procedura per la spedizione**

Il primo recipiente stagno contenente il campione deve essere a sua volta collocato in un secondo contenitore a tenuta stagna, separato dal primo per mezzo di uno strato di materiale assorbente in quantità sufficiente ad assorbire i liquidi presenti nel campione in caso di eventuale fuoriuscita. Il secondo contenitore deve a sua volta essere avvolto in un imballaggio protettivo ed impermeabile per evitare danneggiamenti da agenti fisici o dall'acqua. Sull'esterno del secondo contenitore deve essere applicata, in modo che non sia facilmente asportabile, una scheda con i dati identificativi del contenuto; una copia di questa scheda deve essere immediatamente trasmessa al destinatario mentre una terza deve essere consegnata al responsabile della spedizione. Sull'imballaggio dovrà essere apposto il simbolo di rischio biologico con la dicitura "sostanze infette, in caso di danneggiamento o perdita contattare immediatamente l'Autorità Sanitaria".

### **Procedura per i trasporti locali**

Per trasporto locale viene inteso il trasporto di un campione da un reparto ospedaliero o da una struttura periferica ad un laboratorio o da un laboratorio ad un altro ovvero da una struttura ospedaliera ad un centro diagnostico esterno. A tali situazioni si applicano i medesimi principi di sicurezza richiesti per le altre modalità di trasporto.

Le regole da osservare sono:

- Utilizzo di contenitori per il campione impermeabili e a tenuta stagna; se il campione è costituito da una piastra, essa deve essere opportunamente sigillata.
- Nel caso in cui il contenitore del campione è una provetta, essa deve essere chiusa e collocata in una rastrelliera che la mantenga in posizione verticale; i contenitori dei campioni e le rastrelliere devono essere posti in scatole robuste e a tenuta stagna di plastica o di metallo e ciascuna scatola deve essere etichettata in relazione al contenuto ed accompagnata dalle schede con i dati del campione.
- Qualora, per il trasporto del campione, è previsto l'uso di veicoli, la scatola deve essere sistemata in modo fermo e sicuro nel veicolo stesso e, a bordo, deve essere presente un kit fornito di materiale assorbente, disinfettante a base di cloro, contenitore per rifiuti, guanti da lavoro resistenti e riutilizzabili.

## **8. IMPIEGO CONFINATO DI MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (MOGM)**

Il D. L.vo 206/01 regola l'utilizzo confinato di MOGM con l'obiettivo di tutelare la salute dell'uomo e l'ambiente. Per Microrganismo Geneticamente Modificato si intende *“un microrganismo (ogni entità microbiologica cellulare o non cellulare capace di replicarsi o di trasferire materiale genetico, compresi virus, tiroidi, cellule animali e cellule vegetali in coltura) il cui materiale genetico è stato modificato in modo che non avviene in natura per incrocio e/o ricombinazione naturale...”*. (art. 2, D. L.vo 206/01).

I MOGM vengono classificati in base alla loro pericolosità in 4 classi di rischio: i MOGM di classe 1 presentano rischi nulli o trascurabili mentre i MOGM di classe 4 sono ad alto rischio per l'uomo e per l'ambiente. A ciascuna classe, in analogia con quanto prescritto dal D. L.vo 81/08 e s.m.i. per i microrganismi convenzionali, si applica un corrispondente livello di contenimento. I livelli di contenimento riguardano i laboratori (attrezzature, modalità di funzionamento, rifiuti, altre misure), le serre e le camere di crescita (edifici, attrezzature, modalità di funzionamento), gli stabulari (strutture) e le attività diverse da quelle di laboratorio (aspetti generali, attrezzature, modalità di funzionamento, rifiuti). L'utilizzo di MOGM deve essere preceduto dall'invio di Notifica di Impianto (per la classe 1-4) e/o di Impiego (per le classi 2-4) sottoscritta rispettivamente dal Titolare dell'impianto e dall'Utilizzatore. Nel caso specifico dell'Università di Bologna, in base a quanto sancito dal DM 363/98, il Datore di Lavoro è stato individuato nella persona del Magnifico Rettore mentre l'Utilizzatore nella persona del Responsabile della Didattica e della Ricerca. Di seguito si riporta l'allegato IV al D. L.vo 206/01 con le specifiche misure di contenimento riferite ad ogni livello di rischio e per i diversi comparti di utilizzo.

**ALLEGATO IV - MISURE DI CONTENIMENTO E ALTRE MISURE DI PROTEZIONE**

Le sottoelencate tabelle indicano i requisiti minimi e le misure necessarie, per ciascun livello di contenimento in attività di laboratorio (tabella I) e per altre attività (tabella II). Le tabelle Ib e Ic riportano aggiunte e modifiche, rispetto alla tabella Ia, rispettivamente per serre o camere di crescita (Ib) e per stabulari (Ic).

**Tabella I a - Misure di contenimento, di prevenzione e altre misure di protezione per le attività di laboratorio**

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
1. Ambienti di laboratorio:isolamento (1)	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
2. Laboratorio: sigillabile in modo da consentire la fumigazione	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario

**Attrezzature**

3 Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire.	Necessario (bancone)	Necessario (bancone)	Necessario (bancone, arredo, pavimento)	Necessario (bancone, arredo pavimento, soffitto, pareti)
4 Accesso al laboratorio attraverso zona filtro(2)	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
5 Pressione negativa rispetto alla pressione nelle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Necessario ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario
6 L'aria immessa nel ed emessa dal laboratorio deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA) (3)	Non necessario	Non necessario	Necessario per aria emessa ad eccezione di attività in cui la trasmissione non avviene per via aerea	Necessario per aria immessa ed emessa. Quando si impiegano virus che non sono trattenuti da filtri HEPA si renderanno necessari requisiti supplementari per l'aria emessa
7 Cappa/box di sicurezza microbiologica	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
8 Autoclave	Nel sito	Nell'edificio	Sul piano (4)	in laboratorio = a doppia entrata
9 Presenza di strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale	Necessari apparati di lavaggio	Necessario	Necessario	Necessario
10 Deposito sicuro per MOGM, nonché per attrezzature e materiali di laboratorio contaminati	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

Modalita' di funzionamento	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
11 Accesso limitato	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
12 Segnale di pericolo biologico sulla porta	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
13 Specifica formazione del personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
14 Misure specifiche per controllare la diffusione di aerosol	Non necessario	Necessario minimizzare	Necessario prevenire	Necessario prevenire
15 Il personale deve fare una doccia prima di uscire dalla zona controllata	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
16 Indumenti protettivi	indumenti di protezione adeguati	indumenti di protezione adeguati	indumenti di protezione e (se necessario) calzature adeguate	Cambio completo di indumenti e calzature all'antrata e all'uscita
17 Guanti	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
18 Controllo efficace di possibili vettori (ad esempio per roditori ed insetti)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
19 Specifiche procedure di disinfezione	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario

#### Rifiuti

20 Inattivazione degli MOGM negli effluenti dei lavandini, degli scarichi o delle docce, se presenti, o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
21 Inattivazione degli MOGM nei materiali e nei rifiuti contaminati	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario

#### Altre misure

22 Il laboratorio deve contenere propria attrezzatura	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
23 Deve essere presente una finestra di osservazione, o una soluzione alternativa, che consenta di vedere gli occupanti	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario

(1) Isolamento = il laboratorio e' separato dalle altre zone dello stesso edificio o si trova in un edificio separato

(2) Zona filtro (air lock): l'accesso deve avvenire attraverso una zona filtro che e' un ambiente separato dal laboratorio. Il lato esente da contaminazione della zona filtro deve essere separato dalla parte ad accesso limitato da uno spogliatoio o da impianti doccia e, preferibilmente, da porte interbloccanti.

(3) HEPA = High Efficiency Particulate Air

(4) In base a procedure convalidate che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio e che forniscano un livello di protezione equivalente.

**Tabella Ib - Misure di contenimento e altre misure di protezione per serre e camere di crescita**

I termini serra e camera di crescita si riferiscono ad una struttura dotata di pareti, tetto e pavimento progettata ed utilizzata principalmente per la coltivazione di piante in un ambiente controllato e protetto.

Si applicano tutte le disposizioni della tabella Ia, con le seguenti aggiunte/modifiche:

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4

**Edifici**

1 Serra: struttura permanente (1)	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
-----------------------------------	----------------	------------	------------	------------

**Attrezzature**

3 Accesso mediante compartimento separato dotato di due porte interbloccanti	Non necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario
4 Controllo degli scarichi idrici contaminati	Se necessario	Minimizzare gli scarichi (2)	Impedire gli scarichi	Impedire gli scarichi

**Modalità di funzionamento**

6 Misure per il controllo di specie indesiderate quali insetti, roditori, artropodi	Necessario	Necessario	Necessario	Necessario
7 Procedure per il trasferimento di materiale biologico tra la struttura protettiva della serra o camera di crescita e il laboratorio che impediscano la diffusione di MOGM	Minimizzare la diffusione	Minimizzare la diffusione	Impedire la diffusione	Impedire la diffusione

(1) La serra deve consistere in una struttura permanente dotata di una copertura continua impermeabile, deve essere ubicata in un sito sopraelevato rispetto al terreno in modo da evitare la penetrazione di scoli superficiali e deve essere dotata di porte autochiudenti e munite di serratura.

(2) Nel caso la trasmissione possa avvenire attraverso il terreno

**Tabella Ic - Misure di contenimento e altre misure per le attività degli stabulari**

Si applicano tutte le disposizioni della tabella I a con le seguenti aggiunte/modifiche:

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
<b>Strutture</b>				
1 Isolamento dello stabulario (1)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
2 Strutture per animali (2) separate da porte munite di serratura	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
3 Strutture per animali previste in modo da agevolare la decontaminazione [materiale impermeabile e facilmente lavabile (gabbie ecc)]	Se necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
4 Pavimento e/o pareti facilmente lavabili	Se necessario	Necessario (pavimento)	Necessario (pavimento e pareti)	Necessario (pavimento e pareti)
5 Animali tenuti in installazioni di contenimento adeguate, quali gabbie, recinti o acquari	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Se necessario
6 Filtri per gli isolatori o le camere isolate (3)	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario

(1) Stabulario: un edificio o un'area separata all'interno di un edificio che contiene strutture per animali e altre aree come spogliatoi, docce, autoclavi, magazzini per alimenti, ecc.

(2) Strutture per animali: una struttura impiegata normalmente per ospitare animali da stabulare, da allevare o da esperimento o che viene utilizzata per effettuare interventi chirurgici.

(3) Isolatori: contenitori trasparenti nei quali gli animali di piccole dimensioni vengono confinati all'interno o all'esterno di una gabbia; per gli animali di grandi dimensioni possano essere più appropriate camere isolate.

**Tabella II - Misura di contenimento e altre Misure di protezione per attività diverse .da quelle di laboratorio**

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
<b>Aspetti generali</b>				
1 I microorganismi vivi devono trovarsi in un sistema che separi il processo dall'ambiente (sistema chiuso)	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
2 Controllo dei gas di scarico dal sistema chiuso	Non necessario	Necessario minimizzare il rilascio	Necessario impedire il rilascio	Necessario impedire il rilascio
3 Controllo degli aerosol durante il prelievo di campioni, l'aggiunta di materiale ad un sistema chiuso o il trasferimento di materiale ad un altro sistema chiuso	Se necessario	Necessario minimizzare il rilascio	Necessario impedire il rilascio	Necessario impedire il rilascio
4 Inattivazione della massa dei brodi di coltura prima dell'eliminazione dal sistema chiuso	Se necessario	Necessario con mezzi convalidati	Necessario con mezzi convalidati	Necessario con mezzi convalidati
5 I sigilli devono essere previsti in modo da ridurre al minimo o evitare il rilascio	Nessun requisito specifico	Minimizzare il rilascio	Impedire il rilascio	Impedire il rilascio

Specifiche	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
6 La zona controllata deve essere prevista in modo da circoscrivere la fuoriuscita dell'intero contenuto del sistema chiuso	Se necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
7 La zona controllata deve essere sigillabile in modo da consentirne la fumigazione	Non necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario

#### Attrezzature

8 Entrata attraverso una zona filtro	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
9 Superfici resistenti ad acqua, acidi, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire	Necessario (bancone, se presente)	Necessario (bancone, se presente)	Necessario (bancone, se presente, pavimento)	Necessario (bancone, pavimento, soffitto, pareti)
10 Misure specifiche per ventilare adeguatamente la zona controllata in modo da ridurre al minimo la contaminazione atmosferica	Se necessario	Se necessario	Se necessario	Necessario
11 La pressione atmosferica nella zona controllata deve essere mantenuta al di sotto di quella delle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
12 L'aria immessa ed emessa dalla zona controllata deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA)	Non necessario	Non necessario	Necessario per l'aria emessa. Se necessario per l'aria immessa	Necessario (aria immessa ed emessa)
13 Presenza di strutture per il lavaggio e la decontaminazione del personale	Necessari apparati di lavaggio	Necessario	Necessario	Necessario
14 Deposito sicuro per MOGM, nonché per attrezzature e materiali di laboratorio contaminati	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario

#### Modalità di funzionamento

15 I sistemi chiusi devono essere ubicati in una zona controllata	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
16 L'accesso deve essere limitato al personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
17 Deve essere apposto un segno di pericolo biologico	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
18 Specifica formazione del personale addetto	Non necessario	Necessario	Necessario	Necessario
19 Il personale deve fare una doccia prima di uscire dalla zona controllata	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
20 Il personale deve indossare indumenti protettivi	Necessario (indumenti dilavoro)	Necessario (indumenti dilavoro)	Necessario	Cambio completo prima dell'entrata e dell'uscita

Rifiuti	Livelli di contenimento			
	1	2	3	4
22 Inattivazione degli MOGM negli effluenti dei lavandini e delle docce o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
23 Inattivazione degli MOGM nel materiale e nei rifiuti contaminati compresi gli effluenti di processo prima dello scarico finale	Se necessario	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati

2. In casi particolari, può essere richiesta l'applicazione di opportune combinazioni di specifiche di pari livello, indicate dalla tabella Ia e dalla tabella II.

3. In alcuni casi gli utilizzatori, previo accordo dell'autorità competente, possono non applicare una specifica ad un particolare livello di contenimento o combinare specifiche di due livelli diversi.