



Il rischio biologico

Definizioni

Il D. Lgs. 626/94 riporta le seguenti definizioni:

Agente biologico: “qualsiasi microrganismo anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”.

Microrganismo: “qualsiasi entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o trasferire materiale genetico”.

Coltura cellulare “il risultato della crescita in vitro di cellule derivate da organismi pluricellulari”.

Microrganismo geneticamente modificato (MOGM): “organismo il cui materiale genetico è stato modificato in laboratorio, in un modo che non avviene in natura mediante incrocio e/o ricombinazione naturale”.

Classificazione degli agenti biologici

La valutazione del rischio da agenti biologici deve iniziare con una corretta individuazione dei microrganismi cui il lavoratore può essere esposto. Il rischio di sviluppare un'infezione in seguito all'esposizione ad un agente biologico è, infatti, legata alle seguenti variabili:

- *infettività*, capacità di un microrganismo di penetrare e moltiplicarsi nell'ospite;
- *patogenicità*, capacità di produrre malattia a seguito di infezione;
- *trasmissibilità*, capacità di un microrganismo di essere trasmesso da un soggetto infetto ad un soggetto suscettibile;
- *neutralizzabilità*, disponibilità di efficaci misure profilattiche, per prevenire la malattia, o terapeutiche per la cura;
- *virulenza*, insieme delle caratteristiche di infettività e patogenicità.

In base a tutti questi fattori è stata proposta una classificazione degli agenti biologici in 4 gruppi di rischio che il D. Lgs. 626/94, con l'esclusione del I gruppo, ha riportato nell'articolo 75 e nell'allegato XI.

• **I microrganismi del gruppo 1** sono generalmente non patogeni e presentano poche probabilità di causare malattie nell'uomo, quindi rappresentano un basso rischio sia individuale che collettivo; in tale gruppo sono considerati, per esclusione,





tutti gli agenti non riportati nei gruppi 2, 3 e 4; generalmente questi microrganismi costituiscono la normale *flora microbica*.

- **I microrganismi del gruppo 2** possono causare malattie a seguito di esposizione, quindi costituiscono un moderato rischio individuale. Di norma, per questi sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche, per cui rappresentano un limitato rischio per la collettività. I microrganismi di questo gruppo comprendono sia agenti che si trasmettono per via oro-fecale, come il *Vibrio cholerae*, la *Salmonella* ed il *virus dell'epatite A*, sia agenti a trasmissione aerogena (questi vengono eliminati con la tosse, la fonazione, gli starnuti e penetrano nell'organismo per via respiratoria), come i *virus influenzali* ed il *virus del morbillo*.

- **I microrganismi del gruppo 3** possono causare gravi malattie e costituiscono un elevato rischio individuale; questi possono propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche quindi rappresentano un basso rischio collettivo. Tra gli appartenenti a questo gruppo troviamo microrganismi che riconoscono molteplici vie di contagio (respiratorie, digerente e contatto diretto), come per esempio *Salmonella typhi*, *Virus epatite B*, *Virus dell'AIDS*.

- **I microrganismi del gruppo 4** causano gravi malattie e costituiscono un elevato rischio individuale, questi si propagano facilmente e rapidamente nella comunità, non sono disponibili misure profilattiche e terapeutiche quindi rappresentano un elevato rischio collettivo. Un esempio è dato dal *Virus Ebola*.

Nella valutazione del rischio bisogna, comunque, considerare non solo il tipo di microrganismo cui si può essere esposti ma anche le modalità con le quali l'agente biologico viene manipolato, cioè le procedure adottate, e le quantità cui il lavoratore è esposto durante l'attività lavorativa.





GRUPPO	CARATTERISTICHE	ESEMPI	LIVELLO DI CONTENIMENTO ¹
1	Agente che difficilmente è causa di malattia nell'uomo.	Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis, ecc.	Standard (Buona pratica di laboratorio microbiologico)
2	Agente che può causare malattie nell'uomo e costituisce un serio rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi alla comunità; sono disponibili terapie e profilassi.	Herpes simplex virus 1 e 2; Cytomegalovirus; ecc.	Secondo
3	Agente che può causare gravi malattie nell'uomo e costituisce un serio rischio per i lavoratori; può propagarsi alla comunità; sono disponibili terapia e profilassi.	Brucella abortus; Salmonella typhi; Virus epatite B; Virus dell'AIDS.	Terzo
4	Agente che può causare gravi malattie nell'uomo e costituisce un serio rischio per i lavoratori; può presentare un elevato rischio di propagazione alla comunità; non sono disponibili di norma efficaci misure di terapia e profilassi.	Virus Ebola; Virus della febbre emorragica di Crimea/Congo; Virus di Marburgo	Quarto

¹ Il termine di contenimento indica l'insieme delle procedure di sicurezza da adottare nell'utilizzazione e nella manipolazione in laboratorio degli agenti biologici.

Le vie di trasmissione degli agenti biologici

Le vie di trasmissione degli agenti biologici in ambito lavorativo, soprattutto nell'attività di laboratorio, possono essere diverse da quelle esistenti nell'ambito esterno.

Le più frequenti vie di trasmissione durante le attività di laboratorio sono:

- **Pingestione accidentale** (trasmissione per via orale) che può verificarsi:
 - mediante il pipettamento a bocca di un liquido contenente agenti infettanti;
 - a causa di schizzi o spruzzi in bocca in seguito ad incidenti;
 - a causa del trasporto di microrganismi alla bocca tramite la sigaretta oppure con le mani mediante il consumo di alimenti e bevande che si sono contaminati in laboratorio.

Per tali motivi deve essere assolutamente vietato in qualsiasi laboratorio e per qualsiasi livello di contenimento consumare alimenti e bevande, fumare o pipettare con la bocca.





– **Pinalazione** (trasmissione per via aerea), che generalmente si verifica in seguito alla formazione di aerosol biologici (sospensione di micro-particelle di liquido contenenti agenti biologici nell'aria). Diverse procedure di laboratorio producono aerosol, ed in particolare:

- l'immersione di anse da batteriologia incandescenti in un brodo di coltura;
- la sterilizzazione di un'ansa da batteriologia inoculata su fiamma;
- la miscelazione, la risospensione di microrganismi, l'espulsione a pressione di liquidi con pipette o siringhe;
- l'apertura di provette e di flaconi contenenti liquidi o colture biologiche;
- la centrifugazione;
- la sonicazione;
- la liofilizzazione.

Non tutte le particelle infettanti aerotrasmesse si originano da aerosol: infatti, colture liofilizzate, colonie batteriche essiccate, materiale biologico su tamponi secchi e su tappi di provette e di flaconi, spore fungine possono essere disperse nell'aria quando i contenitori vengono aperti.

Gli aerosol e le particelle aerotrasmesse, date le ridottissime dimensioni, possono rimanere a lungo sospese in aria ed essere trasportate dalle correnti d'aria (generate da sistemi di ventilazione e dal movimento delle persone) e diffondersi rapidamente nell'ambiente circostante lontano dal luogo di origine. In seguito all'inalazione si possono infettare non solo l'operatore, ma i colleghi presenti negli ambienti circostanti;

– **Pinoculazione** (ferite con oggetti taglienti e punture accidentali): questa modalità di infezione è molto frequente nei laboratori e ciò testimonia quanto importante sia la corretta e sicura eliminazione degli oggetti appuntiti e taglienti come prassi da attuare in ogni laboratorio per qualsiasi livello di biosicurezza. L'infezione per inoculazione può anche verificarsi mediante morsi e graffi di animali di laboratorio;

– **la contaminazione della cute o delle mucose** (poco pericolosa quella della cute integra, molto di più quella della cute con ferite o lesioni di continuo e quella delle mucose), che può verificarsi mediante spruzzi o spargimenti sugli occhi o in faccia o sulla cute nonché mediante contatto con superfici, strumenti ed altri oggetti contaminati. Esiste, infatti, anche il rischio di trasferimento diretto di microrganismi dalle dita agli occhi.

La presenza di animali di laboratorio può comportare un'esposizione attraverso tutte le vie di trasmissione precedentemente descritte per passaggio degli agenti patogeni dagli animali ai lavoratori, mediante sangue, urine, feci.



Misure di contenimento

In laboratorio, per ridurre al minimo il rischio di contagio, per i lavoratori che utilizzano agenti biologici, sono previsti **quattro diversi livelli** di contenimento relativi ai 4 diversi gruppi di agenti biologici.

Il primo livello si applica quando si utilizzano agenti del gruppo 1, che presentano un basso rischio sia per i lavoratori sia per l'ambiente esterno. Il contenimento è garantito solo dall'uso corretto di pratiche e tecniche microbiologiche, miranti sia alla salvaguardia dell'operatore sia dei campioni di laboratorio.

L'applicazione di buone pratiche di laboratorio deve essere considerata basilare anche per i livelli di biosicurezza superiori e non può essere sostituita da attrezzature e presidi di protezione che potranno essere solo di supporto. Le procedure da attuare per il primo livello di contenimento sono riportate nella **scheda n°1**.

Il livello di biosicurezza 2 deve essere applicato per gli agenti a moderato rischio individuale e ambientale (agenti del gruppo 2); interessa i laboratori clinici, diagnostici ed anche didattici e di ricerca. Questo livello prevede tutte le precauzioni del livello di biosicurezza 1 e, in aggiunta, quelle riportate nelle **schede n° 2 e 5**.

Il livello di biosicurezza 3 deve essere seguito per gli agenti biologici del gruppo 3. Il personale addetto deve ricevere una formazione particolarmente adeguata sulla manipolazione di questi agenti. Devono essere seguite tutte le precauzioni dei livelli di biosicurezza 1 e 2 e, in aggiunta, quelle riportate nelle **schede n° 3 e 5**.

Il livello di biosicurezza 4 è il più elevato livello di contenimento e deve essere attuato in una unità funzionale completamente isolata da tutte le altre aree del laboratorio e dell'edificio. Il laboratorio deve essere completamente sigillato (pavimenti, pareti, soffitti) rispetto alle altre aree del laboratorio e deve essere sufficientemente grande da consentire la contemporanea presenza di almeno due persone. Infatti, il lavoratore deve essere sempre accompagnato da una seconda persona in grado di fronteggiare eventuali situazioni di emergenza. L'ingresso deve avvenire attraverso un locale a tenuta ermetica con le porte interconnesse elettricamente (sistema d'ingresso a doppia porta); nel locale deve essere disponibile una doccia di emergenza.

Al fine di impedire una fuoriuscita di agenti patogeni, nel laboratorio deve essere mantenuta una pressione negativa e l'aria in uscita deve passare attraverso un sistema di almeno 2 filtri HEPA¹ prima di essere eliminata all'esterno. Il personale, prima di entrare, deve cambiarsi interamente gli indumenti e non è consentito indossare vestiti all'interno dell'abbigliamento protettivo; una volta usciti dal laboratorio è necessario effettuare una doccia nella zona filtro prima di rivestirsi con gli indumenti normali.

¹ HEPA (High efficiency particulate air) o filtri assoluti; essi trattengono particelle di dimensioni di 0,3 µm, per cui l'aria che ne fuoriesce è definita pura.





Deve essere prevista un'autoclave del tipo a due porte, di cui una deve essere apribile dall'interno del laboratorio e l'altra dalle aree esterne, al fine di consentire il recupero del materiale sterilizzato dall'esterno del laboratorio.

Tutti i liquidi di scarico, compresa l'acqua della doccia, devono passare attraverso un sistema di trattamento autonomo di sterilizzazione prima dello scarico finale. La manipolazione dei patogeni umani di classe 4 deve essere fatta in cappe di sicurezza biologica di classe III; in alternativa, si possono utilizzare cappe di classe II ma solo indossando idonee tute ventilate a pressione positiva (**schede 4 e 5**).

Procedure di emergenza

È necessario predisporre opportuni piani di emergenza per i livelli di biosicurezza 2, 3 e 4 che prevedono, non solo il comportamento da attuare immediatamente dopo spargimenti o di altre circostanze impreviste che liberano materiale infetto, ma anche le procedure per decontaminare il laboratorio successivamente all'evento.

Gli incidenti che si possono verificare sono i seguenti:

- **esposizione a bioaerosol;**
- **spargimenti di sostanze infette;**
- **punture e ferite.**

In caso di esposizione ad un bioaerosol biologico occorre:

- trattenere il respiro ed abbandonare immediatamente il laboratorio avendo cura di chiudere la porta e di avvisare le altre persone presenti nel laboratorio;
- rimuovere attentamente il camice protettivo e riporlo in un sacco "biohazard";
- lavarsi le mani e la cute esposta con acqua e sapone disinfettante (**vedi tabella 1**);
- affiggere un apposito segnale di contaminazione biologica ed assicurarsi che il laboratorio sia evacuato per almeno 30 min (tale periodo è necessario affinché l'aerosol si depositi);
- segnalare l'incidente al Responsabile del laboratorio;
- chiedere immediatamente l'assistenza medica per i soggetti esposti.

La caduta accidentale di provette, matracci, flaconi, con conseguente rottura con fuoriuscita di liquidi (ad es. colture), rappresenta uno dei più frequenti incidenti di laboratorio; in tale situazione è indispensabile un intervento di bonifica immediato che può differenziarsi in relazione al livello di biosicurezza presente nel laboratorio (**scheda 4**).

In caso di puntura o ferita è necessario:

- favorire l'uscita di sangue dalla ferita;
- lavare l'area interessata con sapone disinfettante ed acqua tiepida;
- segnalare l'incidente al Responsabile del laboratorio che dovrà inoltrare la relativa denuncia all'INAIL;
- chiedere immediata assistenza medica.





SCHEDA 1: NORME DI BUONA TECNICA

- Pulire i banchi di lavoro con adatte soluzioni detergenti e disinfettanti all'inizio ed al termine di ogni manipolazione di agenti biologici (**vedi tabella 2**);
- mantenere porte e finestre chiuse, ridurre al minimo gli spostamenti degli operatori e la presenza di eventuali visitatori durante la manipolazione delle culture microbiche;
- ricorrere all'uso di anse monouso per limitare le operazioni di flambatura che può provocare la formazione di aerosol;
- evitare di pipettare con la bocca qualsiasi materiale biologico, utilizzando gli appositi sistemi di aspirazione automatici o manuali;
- evitare la formazione di aerosol durante la centrifugazione, la sterilizzazione, la sonicazione, la liofilizzazione, o, ancora, in seguito all'apertura di contenitori di campioni biologici, utilizzando centrifughe, autoclavi, ecc. progettati in funzione della sicurezza, o compiendo tali operazioni sotto cappa;
- proteggere viso ed occhi con appositi Dispositivi di Protezione Individuale (D.P.I.) durante tutte le operazioni che possono in qualche modo provocare schizzi o produzione di aerosoli.



SCHEDA 2: PROCEDURE DI CONTENIMENTO "LIVELLO DI BIOSICUREZZA 2"

- Il laboratorio, anche se non necessita di un particolare isolamento, deve essere separato dai locali destinati al pubblico da una porta che resterà chiusa durante le ore di lavoro; ciò per evitare che persone non autorizzate vi abbiano libero accesso;
- all'interno del laboratorio deve essere presente un lavabo, possibilmente in prossimità dell'uscita;
- si devono prevedere attaccapanni distinti per i camici e per gli abiti comuni;
- le pareti ed il pavimento del laboratorio devono essere lavabili e disinfettabili;
- ogni posto di lavoro e tutte le attrezzature utilizzate devono essere pulite e decontaminate, con idoneo disinfettante (**vedi tabella 2**), almeno una volta al giorno;
- utilizzare solo sistemi di pipettamento automatici o meccanici, e vietare il pipettare a bocca qualsiasi soluzione o sospensione, per ridurre al minimo il rischio di ingestione di materiale contaminato;





- utilizzare tutti gli accorgimenti possibili, nelle varie attività, per ridurre al minimo la formazione di aerosol;
- utilizzare DPI quali: camici, guanti, maschere, occhiali ecc. durante l'attività in laboratorio. I DPI vanno rimossi prima di lasciare il laboratorio per evitare di portare all'esterno microrganismi potenzialmente pericolosi;
- le attrezzature devono essere decontaminate prima di ogni eventuale invio alla riparazione o alla manutenzione e prima di ogni trasporto: questa misura riduce il potenziale rischio infettivo (ed anche quello legato alla eventuale presenza di residui di prodotti chimici pericolosi) per quei soggetti (ad es. addetti al trasporto, alle attività di manutenzione e riparazione) che vengono in contatto con le apparecchiature di laboratorio. Se l'intervento di manutenzione avviene all'interno del laboratorio è anche indispensabile fornire agli addetti camici, guanti, mascherine, occhiali di protezione e quant'altro sia necessario per una protezione personale adeguata.

Per le **attrezzature** normalmente usate procedere alla decontaminazione periodica secondo le seguenti indicazioni generali:

- cappe a flusso laminare, incubatori e termostati: far circolare al loro interno vapori di formalina e disinfettare le superfici con idoneo disinfettante (**vedi tabella 2**);
 - per le altre strumentazioni: utilizzare disinfettanti liquidi con un panno imbevuto per le superfici facilmente raggiungibili oppure utilizzare disinfettanti spray per le superfici difficilmente raggiungibili con il panno; quando i materiali e le dimensioni lo consentono si può anche procedere a sterilizzazione in autoclave;
 - tutte le soluzioni ed i rifiuti contaminati devono essere opportunamente decontaminati prima dell'eliminazione e devono essere smaltiti secondo le disposizioni vigenti in materia.
- Il personale deve lavarsi le mani dopo aver manipolato materiale contaminato e animali, anche se ha indossato i guanti protettivi, prima di uscire dal laboratorio ed in ogni caso al cessare dell'attività lavorativa. Queste misure riducono le possibilità di venire in contatto con microrganismi patogeni e con sostanze chimiche pericolose; riducono anche le probabilità di trasportare microrganismi ad altri laboratori, agli uffici ed, eventualmente, nelle proprie abitazioni;
 - nell'area di lavoro non si deve mangiare, bere, fumare né applicarsi cosmetici. È anche vietato applicare o rimuovere lenti a contatto. Le lenti a contatto dovrebbero essere portate solo se non sono disponibili altri mezzi di correzione e sempre con occhiali di protezione. Eventuali alimenti possono essere conservati in frigoriferi appositamente dedicati e collocati al di fuori dell'area di lavoro;
 - deve essere predisposto un programma di controllo di insetti e roditori;
 - non è necessario l'utilizzo di cappe di sicurezza biologica.





SCHEDA 3: PROCEDURE DI CONTENIMENTO “LIVELLO DI BIOSICUREZZA 3”

È necessario applicare tutte le procedure riportate nella **scheda 2** (livello di biosicurezza 2);



- il laboratorio deve essere isolato rispetto alle aree pubbliche, agli uffici, etc. mentre negli ospedali deve essere isolato dalle aree destinate ai pazienti. È necessario che il laboratorio sia contrassegnato con il **segnale di rischio biologico**. Gli arredi devono essere dotati di superfici facilmente pulibili. Lo spogliatoio dove riporre gli indumenti di lavoro (camici, tute, etc.) deve essere posizionato vicino all'uscita. Un sistema di sterilizzazione (autoclave, stufa a secco, etc.) deve essere disponibile nel laboratorio o nelle immediate vicinanze. Le porte del laboratorio devono chiudersi automaticamente;

- è vietata la conservazione di alimenti;
- nei casi in cui una qualsiasi manipolazione possa comportare la formazione di aerosol, questa deve essere effettuata sotto cappa di tipo biologico di sicurezza di classe I o II (**vedi tabella 4**). L'aria proveniente da queste cappe deve essere trattata con filtri HEPA prima di essere reimpressa nell'ambiente di lavoro;
- le centrifugazioni devono essere effettuate esclusivamente con provette chiuse con tappo a vite, o con centrifughe dotate di rotor provvisti di dispositivi di contenimento degli aerosol che vanno aperte solo nella cappa biologica di sicurezza;
- deve essere elaborata e resa disponibile una procedura da mettere in atto in caso di incidente e/o di emergenza biologica;
- durante le attività di laboratorio è necessario indossare sempre camici che devono essere utilizzati solo all'interno dell'area di contenimento e non in aree diverse dai laboratori (uffici, mense, bar o punti di ritrovo);
- bisogna prestare particolare attenzione per evitare una contaminazione della cute con materiale infetto: quando si attuano procedure che possono comportare un rischio di contaminazione con sangue, materiali o animali infetti si devono indossare guanti idonei. Dopo l'uso, i guanti vanno eliminati con il materiale infetto ed è necessario lavare le mani;
- la vetreria contaminata deve essere sterilizzata in autoclave o trattata con disinfettanti prima di ogni lavaggio e manipolazione;
- il personale di pulizia va informato sui possibili rischi legati alla presenza di agenti del gruppo 2 e deve pulire solo i pavimenti. Il personale del laboratorio ha la responsabilità di rendere il laboratorio sicuro durante le quotidiane operazioni di pulizia;
- il personale addetto deve essere sottoposto a sorveglianza sanitaria.





SCHEDA 4: PROCEDURE DI CONTENIMENTO: “LIVELLO DI BIOSICUREZZA 4”

- È necessario applicare tutte le procedure riportate nelle **schede 2 e 3** (livelli di biosicurezza 2 e 3);
- il laboratorio deve essere separato dalle altre aree da un'anticamera che può anche fungere da spogliatoio. Le porte devono chiudersi da sé ed, eventualmente, poter essere chiuse a chiave. Una doccia di emergenza deve essere disponibile nelle vicinanze. Un lavabo con comando a pedale, a gomito o automatico deve essere disponibile nel laboratorio e collocato vicino all'uscita;
- deve essere presente un impianto di aerazione che crei un flusso di aria dall'esterno verso l'interno del laboratorio. La pressione interna al laboratorio deve essere, infatti, negativa rispetto alle altre aree di lavoro circostante. L'aria in uscita non può essere fatta ricircolare all'interno dell'edificio ma, attraverso un proprio sistema di ventilazione, deve essere espulsa all'esterno dell'edificio; ciò può essere attuato senza previa filtrazione con filtri HEPA. Se non è possibile realizzare un sistema di ventilazione separato, il flusso d'aria in uscita deve passare attraverso un filtro HEPA prima di essere convogliato nel sistema di ventilazione dell'edificio;
- le finestre del laboratorio devono essere chiuse e sigillate. Nell'area di lavoro deve essere collocato una autoclave; se ciò non è possibile, il materiale contaminato deve essere preventivamente trattato con disinfettanti chimici e trasportato in un doppio sacco autoclavabile chiuso;
- gli arredi di laboratorio devono essere facilmente pulibili e resistenti ai disinfettanti chimici;
- il personale, prima di entrare in laboratorio deve indossare un idoneo camice chiuso sul retro. I camici devono essere autoclavati dopo l'uso;
- la manipolazione di materiale infetto deve essere attuata in cappa biologica di sicurezza o, comunque, con dispositivi di protezione e misure di contenimento idonee. Ad esempio, la centrifugazione deve essere effettuata con provette chiuse con tappo a vite e con rotori a chiusura ermetica; i rotori vanno, poi, trasportati nella cappa di sicurezza per consentire la rimozione delle provette centrifugate. L'aria proveniente dalle cappe di sicurezza biologica deve passare attraverso filtri HEPA e può essere scaricata direttamente all'esterno;
- devono sempre essere disponibili soluzioni di disinfettanti efficaci;
- devono essere sempre disponibili procedure scritte riguardo l'eliminazione dei rifiuti, le procedure di disinfezione e le misure di emergenza;
- i lavoratori devono essere sottoposti a sorveglianza medica; è, altresì, necessario prelevare e conservare campioni di siero di riferimento di tutto il personale esposto;
- il personale addetto alle pulizie e alla manutenzione deve rispettare gli stessi protocolli dello staff di laboratorio e deve essere sempre accompagnato;
- è necessario attuare un programma di monitoraggio per verificare l'effettivo contenimento del laboratorio.





SCHEDA 5: PROCEDURE DI BONIFICA IN CASO DI SPARGIMENTO DI MATERIALE INFETTO

Livello di biosicurezza 2

In caso di incidente occorre segnalare immediatamente l'accaduto alle altre persone presenti nel laboratorio al fine di impedire un'ulteriore diffusione dell'eventuale contaminante e occorre seguire le seguenti procedure:

- è necessario liberarsi degli indumenti contaminati, lavare e disinfettare la cute esposta con appositi disinfettanti;
- dopo aver protetto con i DPI adeguati il corpo, le mani e la faccia occorre:
 - a) coprire l'area contaminata con carta o materiale assorbente,
 - b) versarvi sopra una soluzione disinfettante concentrata e lasciare agire per un tempo sufficiente (almeno 15 minuti). Gli eventuali frammenti di vetro devono essere prelevati con pinza e/o paletta (possibilmente monouso) e devono essere riposti in un idoneo contenitore resistente alla puntura;
- tutto il materiale monouso utilizzato per la disinfezione deve essere eliminato con i rifiuti biologici;
- il materiale riutilizzabile (ad es. pinze metalliche, etc.) deve essere decontaminato prima di essere avviato al lavaggio;
- le mani vanno lavate con sapone disinfettante.

Livello di biosicurezza 3

- In caso di incidente occorre segnalare immediatamente l'accaduto alle altre persone presenti nel laboratorio, al fine di impedire un'ulteriore diffusione dell'eventuale contaminante;
- trattenere il respiro ed abbandonare immediatamente il laboratorio avendo cura di chiudere la porta per limitare la diffusione della contaminazione;
- è necessario affiggere un apposito segnale di contaminazione biologica;
- deve essere immediatamente informato il Responsabile del laboratorio;
- non rientrare prima di 30-40 minuti prima nel laboratorio (questo periodo di tempo è necessario per permettere la deposizione di un eventuale aerosol formatosi nell'incidente);
- prima di effettuare l'intervento di disinfezione è necessario indossare i DPI adeguati (quali guanti, camice monouso, calzari, occhiali e mascherina chirurgica);
- dopo aver provveduto a circoscrivere la zona dell'incidente come descritto nella procedura relativa al livello di biosicurezza 1, protrarre il periodo di contatto del disinfettante per almeno 20 minuti, anziché 15 come per il livello 1;
- l'area interessata deve essere spruzzata con una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) e lasciata asciugare;
- tutto il materiale utilizzato per la disinfezione deve essere riposto in un sacco "biohazard" autoclavabile per la sterilizzazione in autoclave.





In caso di contaminazione con sangue o con materiale ad elevato contenuto organico e con bassa concentrazione di microrganismi patogeni occorre seguire le seguenti procedure:

- indossare i DPI adeguati (quali guanti, camice monouso, calzari, occhiali e mascherina chirurgica);
- il sangue deve essere assorbito con carta assorbente e riposto in un sacco “biohazard” autoclavabile;
- ogni eventuale frammento di vetro deve essere prelevato con pinze e/o palette (possibilmente monouso) e riposto in un idoneo contenitore resistente alle perforazioni;
- pulire l'area da ogni traccia di sangue utilizzando una soluzione detergente;
- l'area deve essere spruzzata con una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina), lasciata ad asciugare per 15 minuti. L'area deve essere pulita con panno imbevuto di ipoclorito e tutto il materiale utilizzato per la disinfezione deve essere riposto in un sacco “biohazard” autoclavabile;
- il materiale riutilizzabile (ad es. pinze metalliche etc.) deve essere decontaminato.

Livello di biosicurezza 4

Le procedure che seguono sono mirate soprattutto per gli incidenti che si verificano al di fuori della cappa di sicurezza o che provocano un aerosol nel laboratorio (es. mal funzionamento dei dispositivi di contenimento fisico durante la centrifugazione).

- Occorre seguire tutte le misure prescritte per gli altri livelli di biosicurezza;
- il camice protettivo deve essere rimosso nella zona filtro e riposto in un sacco “biohazard” autoclavabile; dopo essersi tolto il camice è necessario togliersi i guanti e lavare le zone cutanee esposte con acqua tiepida e sapone antisettico;
- in caso di puntura o ferita l'area interessata deve essere lavata con sapone disinfettante ed acqua tiepida per 15 minuti; è utile favorire l'uscita di sangue dalla ferita;
- in caso di esposizione oculare occorre lavarsi gli occhi nell'apposito lavaocchi per 15 min.;
- è opportuno decontaminare le aree circostanti (pavimenti e superfici di lavoro) mediante carta assorbente imbevuta di varechina lasciando agire il disinfettante per 15-20 minuti;
- la procedura di decontaminazione deve essere ripetuta una seconda volta;
- tutti gli strumenti non monouso utilizzati per le procedure precedenti (es. pinze) devono essere decontaminati mediante immersione in soluzione disinfettante (sufficiente varechina per 15-20 min avendo cura, per le proprietà corrosive proprie dell'ipoclorito, di risciacquare con acqua per rimuovere i residui di disinfettante);
- il camice protettivo utilizzato durante le procedure di disinfezione deve essere rimosso accuratamente e riposto in un sacco “biohazard” autoclavabile; dopo aver tolto i guanti, la mascherina e gli occhiali protettivi è necessario lavarsi le mani con acqua tiepida e sapone antisettico;
- tutti i rifiuti prodotti durante la decontaminazione devono essere sterilizzati in autoclave (occorre utilizzare guanti nuovi per trasferire il suddetto materiale nell'autoclave ed al termine lavarsi nuovamente le mani).





KIT DI DECONTAMINAZIONE

È necessario predisporre uno in ogni laboratorio; il kit deve essere costituito da un secchio, in materiale resistente, con applicato all'esterno il simbolo "biohazard", contenente il seguente materiale:

- varechina concentrata (tipo domestico);
- bottiglia spray (dovrà essere preparata una soluzione al 10% di varechina);
- pinze per prelevare il materiale tagliente e/o paletta (possibilmente monouso);
- carta assorbente;
- sacchi "biohazard" per la raccolta del materiale utilizzato per la decontaminazione;
- guanti monouso;
- D.P.I. per il viso (mascherina, occhiali).





COMPOSTO	APPLICAZIONI E PRECAUZIONI
Alcool etilico, etanolo 70%	Antisepsi della cute integra, mantenere sulle mani per almeno 2 min, non usare sulle ferite. L'uso frequente causa secchezza ed irritazione della cute. Associato ad altri principi attivi (clorexidina, iodio e derivati, sali di ammonio quaternario) aumenta l'efficacia. Composto volatile ed infiammabile.
Cloroderivati: clorossidante elettrolitico 5%	Ampio spettro d'azione, antisepsi di ferite superficiali, ustioni. Soluzioni concentrate possono essere irritanti e tossiche.
Clorexidina al 4%	Può essere associata ad alcool etilico 70%. Antisepsi di ferite, ustioni, lavaggio delle mani. Evitare il contatto con gli occhi e le orecchie. Alle concentrazioni normalmente impiegate non presenta effetti indesiderati.
Iodio e iodofori	Le soluzioni a base di iodio e gli iodofori sono potenzialmente irritanti per la cute. A basse concentrazioni in soluzione acquosa sono indicate per piccole ferite, in base detergente per il lavaggio delle mani.

Tabella 1 - Disinfettanti per la cute.

COMPOSTO	APPLICAZIONI E PRECAUZIONI
Glutaraldeide 2% attivata	Presenta attività disinfettante ad alto livello. E' impiegata come agente chimico sterilizzante a freddo. Attiva in presenza di sostanze organiche, non corrode i metalli. Indicata per la plastica, gomma, materiale da laboratorio, lenti e fibre ottiche. Non usare su superfici e piani di lavoro. Prodotto tossico, evitare l'esposizione della cute e delle mucose a vapori e soluzioni. Indossare guanti ed occhiali protettivi.
Derivati fenolici (es. ortofenilfenolo)	Disinfezione pavimenti, superfici, arredi, oggetti. Stabile in presenza di materiale organico. Sono assorbiti da plastica, gomma, silicone da cui si rimuove con difficoltà. Irrita la cute e le mucose, usare guanti e occhiali protettivi.
Formalina al 37%	Disinfezione, superfici, arredi, oggetti. Poco stabile in presenza di materiale organico. Prodotto volatile, irrita la cute e le mucose. Usare occhiali protettivi, guanti.
Cloroderivati: Cloramina T, Ipoclorito di sodio (candeggina)	Disinfettanti di 1° scelta per oggetti, superfici contaminate, sporche di sangue o materiale organico. Danneggiano i metalli. Non usare in presenza di acidi. Prodotti tossici, usare guanti e occhiali protettivi.

Tabella 2 - Disinfettanti per gli apparecchi e per le superfici di lavoro.





AGENTE CHIMICO o FISICO	ATTIVITA'	VANTAGGI	USO	OSSERVAZIONI
Alcoli (etanolo, alcol isopropilico) (De), (Di)	- denaturano le proteine; - inibiscono il metabolismo cellulare.	- basso costo; - bassa tossicità; - alta attività su batteri e micobatteri; - scarsa attività su virus; - non interagiscono con detergenti.	- eccellenti antisettici su pelle integra.	- inattivati dallo sporco; - scarsamente inattivati da proteine, materiali naturali, materiali sintetici, acqua dura; - facilmente infiammabili; - scarsa tossicità per gli occhi; - attività nulla su funghi e spore.
Aldeidi (St)	- denaturano le proteine; - alchilano DNA ed RNA.	- attive su batteri, micobatteri, spore (oltre 40 °C la Formaldeide, oltre 20°C la Glutaraldeide) e funghi; - poco attivo su virus.	- sterilizzazione di strumentazione termolabile.	- temperatura, tempi di contatto e pH dipendenti; - alta tossicità (la formaldeide è cancerogena); - scarsamente inattivate da proteine, materiali naturali, materiali sintetici, acqua dura; - scarsa tossicità per pelle, occhi, polmoni; possibili effetti allergici e irritanti.
Clorexidina (De), (Di)	- interagisce con le membrane cellulari.	- bassa tossicità; - attivo sullo sporco.	- antisettico topico su ferite ed escoriazioni.	- incompatibile con detergenti anionici.
Ipoclorito di sodio (De), (Di)	- ossida i legami peptidici; - denatura le proteine.	- basso costo; - ampio spettro; - facilmente reperibile; - alta attività su batteri; - discreta attività su micobatteri e spore; - scarsa attività su virus e funghi.	- igienizzante delle superfici; - trattabile con acqua.	- pH sensibile; - si lega a sostanze organiche come le ammine; - scarsa tossicità per pelle, occhi, polmoni; - inattivato da proteine; - scarsamente inattivato da materiali naturali, sintetici, acqua dura e detergenti cationici; - non utilizzabile con acidi e basi forti.
EDTA (Ac. Etilen-Diamminotetra-Acetic) (De), (Di)	- aumenta la permeabilità di pareti e membrane cellulari.	- migliora l'efficacia degli antibiotici.	- Pseudomonas - Proteus - Staphylococcus	- bassa attività battericida; - non ad ampio spettro; - irritante.
Ossido di Etilene (St)	- alchila gli acidi nucleici (DNA)	- alta attività battericida.	- sterilizzazione di materiali termolabili.	- cancerogeno; - tossico; - mutageno; - infiammabile; - esplosivo.
Iodio (Di)	- interrompe i meccanismi di trasporto dell'ossigeno.	- sporicida - cisticida	- antisettico chirurgico cutaneo.	- tossico; - attivo solo in certe forme.
Perossidi (perossido di idrogeno, gas plasma) (St)	- dissolvono le pareti cellulari; - denaturano le proteine.	- basso costo (perossido di idrogeno); - non inquinante per l'ambiente; - non tossico per i tessuti biologici.	- sterilizzazione di strumenti di laboratorio e piccole attrezzature.	- citotossici; - poco stabile; - strumentazione costosa (per il gas plasma); - scarsa efficacia in presenza di materiale organico.

Tabella 3 - Principali agenti chimici e fisici usati per Decontaminazione (De), Disinfezione (Di) e Sterilizzazione (St)





segue tabella 3

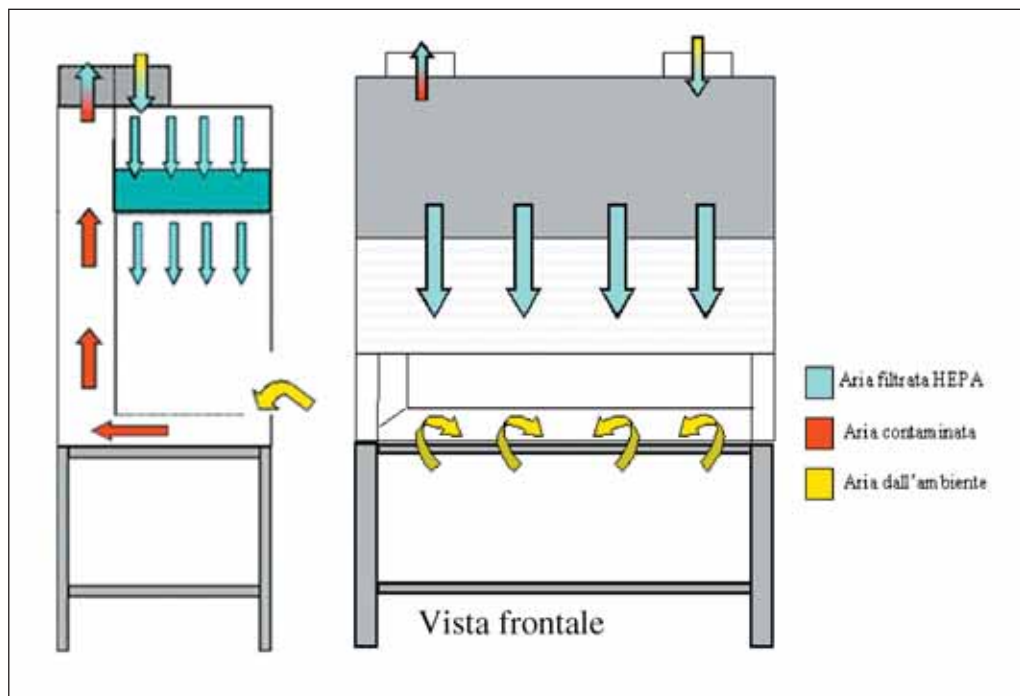
Ozono (Di)	- "super ossigeno" nativo; - ossida proteine e lipidi insaturi.	- si dissolve in acqua; - non lascia residui.	- disinfettante dell'acqua.	- instabile; - irritante.
Fenoli (Di)	- penetrano la parete cellulare; - denaturano le proteine.	- penetrano i legni e le superfici porose; - alta attività su funghi, batteri; - discreta attività su micobatteri; - scarsa attività su virus.	- antisettici topici; - disinfettanti ambientali.	- tossici, corrosivi; - minima attività sporicida; - discretamente inattivati da materiali naturali e sintetici; - scarsamente inattivati da proteine e acqua dura; - penetrano facilmente attraverso la pelle; - irritanti.
Ammonio quaternario e sali fenolici d'ammonio quaternario (De), (Di)	- interagisce con le membrane cellulari pregiudicando e la permeabilità.	- surfattanti che distruggono i lipidi; - utilizzabile su superfici; - generalmente non tossico per i mammiferi.	- disinfettante ambientale.	- inattivato dai lipidi.
Calore umido sotto Pressione (autoclave) (St)	- denatura proteine ed acidi nucleici.	- attivo su batteri, micobatteri, funghi e virus; - migliore sistema sporicida.	- strumenti e piccole attrezzature resistenti ad alte pressioni (1-3 bar) e ad alte temperature (120-130 T).	- distrugge i materiali termolabili; - inefficace contro organismi resistenti al vapore.
Calore secco (stufa ad aria calda) Di (100°C per 1 h), St (160°C per 2 h, 170°C per 1 h) (St)	- denatura proteine ed acidi nucleici.	- attivo su batteri, micobatteri, spore, funghi e virus.	- sterilizzazione di materiali impermeabili o danneggiabili dall'umidità (vetro, strumenti affilati, metallo).	- distruttivo per materiali che non resistono alle alte temperature per lunghi periodi di tempo.
Luce ultravioletta (St)	- agisce sul DNA e crea dimeri di timidina.	- poco costoso; - ampio spettro.	- sterilizzazione di superfici, acqua, aria.	- agisce in superficie - agisce in uno spazio estremamente limitato e richiede una corretta manutenzione con frequenti pulizie della lampada; - basta un sottile strato di polvere per vanificare il funzionamento provoca tumori alla pelle.
Radiazioni gamma (St)	- denatura il DNA, le proteine e le pareti cellulari.	- rapido; - ampio spettro.	- strumenti e piccole attrezzature.	- richiede attrezzature costose.





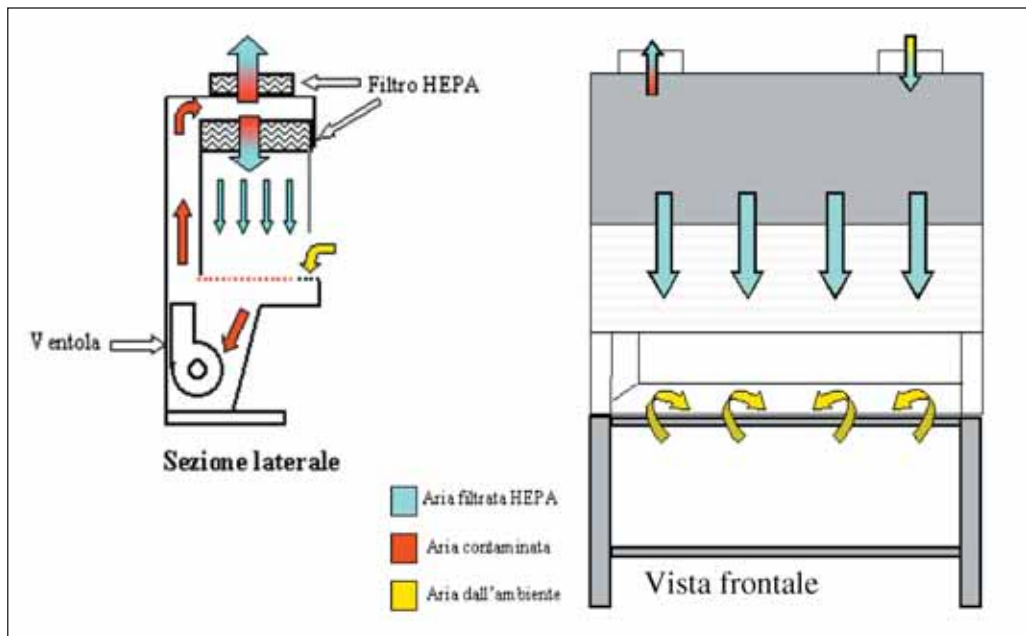
CLASSE	% aria in ricircolo	CARATTERISTICHE PRINCIPALI	IMPIEGHI	PROTEZIONE OPERATORE AMBIENTE CAMPIONE		
				OPERATORE	AMBIENTE	CAMPIONE
I	=	Apertura frontale. Contenzione data dall'aria esterna richiamata dall'apertura frontale. Filtro HEPA in uscita.	Basso rischio; microrganismi di gruppo 2-3	buona	ottima	scarsa
II A	70	Apertura frontale che permette l'ingresso dell'aria. Flusso lamellare verticale nell'aria di lavoro.	Rischio medio; microrganismi di gruppo 2-3	buona	ottima	ottima
II B1	30	Filtri HEPA in ingresso ed in uscita				
II B2	0	Se oltre al campione biologico sono presenti mutagene o cancerogene o radioattive l'aria espulsa deve essere convogliata all'esterno.				
III	=	Chiusura a tenuta di gas, funzionano in pressione negativa, accesso consentito da guanti da cui la denominazione "glove box". Filtro HEPA in ingresso, Doppio filtro HEPA in uscita.	Alto rischio; microrganismi di gruppo 4	ottima	ottima	ottima

Tabella 4 - Classificazione cappe di sicurezza biologica.

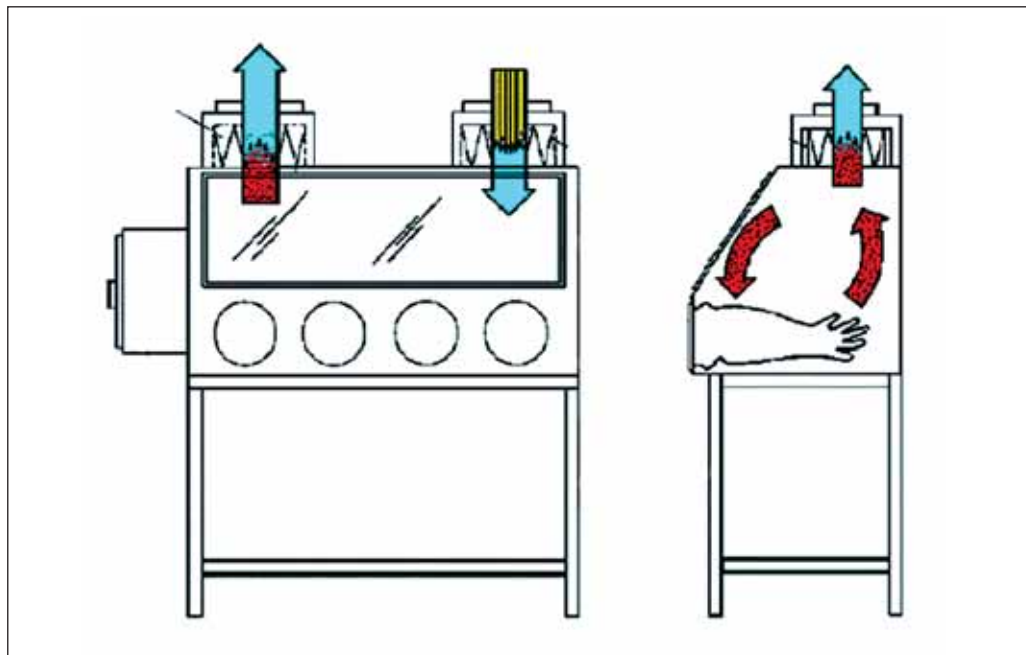


Cappe biologiche classe I





Cappe biologiche classe II



Cappe biologiche classe III



