

N. Vonesch, P. Tomao, S. Di Renzi, S. Vita, S. Signorini

La biosicurezza nei laboratori per gli esposti ad agenti biologici

Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro - Dipartimento Medicina del Lavoro

RIASSUNTO. L'esposizione ad agenti biologici e gli effetti che possono derivarne (infezione, malattia) per gli addetti ai laboratori clinici, diagnostici e di ricerca nonché le soluzioni proposte ed attuate al fine di contenere e controllare il rischio, costituiscono tuttora motivo di interesse per la comunità scientifica, come dimostrato dalle numerose pubblicazioni prodotte sull'argomento, nonché una sfida per coloro che si occupano della tutela della sicurezza e della salute di tale categoria di lavoratori. Nel presente lavoro sono stati presi in considerazione alcuni aspetti che concorrono alla biosicurezza quali i riferimenti normativi, le linee guida, le buone prassi, i livelli di sicurezza in relazione alla classificazione dell'agente biologico ed al tipo di operazione effettuata, alcuni dispositivi di protezione collettiva ed individuale e la profilassi vaccinale.

Parole chiave: agenti biologici, addetti ai laboratori, biosicurezza.

ABSTRACT. Laboratory workers are exposed to a variety of potential occupational health hazards including those deriving from infectious materials and cultures, radiations, toxic and flammable chemicals, as well as mechanical and electrical hazard. Although all of them are significant, this paper will focus on biological hazards present in clinical and research laboratories. In fact, in spite of numerous publications, guidelines and regulations, laboratory workers are still subject to infections acquired in the course of their researches. This paper describes some aspects that include good microbiological practices (GMPs), appropriate containment equipment, practices and operational procedures to minimize workers' risk of injury or illness.

Key words: biological agents, laboratory workers, biosafety.

Introduzione

Ogni anno nove chirurghi dei diecimila presenti in Italia e cento infermieri professionali dei trecentomila totali contraggono l'epatite C lavorando. Il 78% dei contagi è dovuto a punture accidentali e a tagli con materiali infetti. Da questi dati si evince che il rischio da agenti biologici rappresenta tuttora un problema nel settore sanitario (1). Varie strategie sono state intraprese nel tentativo di arginare il fenomeno: negli Stati Uniti per merito di una legge federale (Public Law 106-430 del 6 novembre 2000) che impone l'impiego di aghi di sicurezza, si è riusciti a ridurre le punture pericolose di ben l'85%. Quanti sono i laboratoristi interessati da tale problematica e quali "strumenti" hanno a disposizione per proteggersi? Nel 1995 negli Stati Uniti circa cinquecentomila lavoratori risultavano impiegati in laboratori di dimensioni e complessità variabile da grandi a piccoli, sia clinici che di ricerca (2). Attualmente in Italia si contano circa 45.000 tecnici di laboratorio secondo i dati dell'Associazione Italiana Tecnici di Laboratorio (3). Questi lavoratori risultano esposti ad una varietà di rischi per la salute che includono i materiali infetti, le radiazioni, le sostanze chimiche infiammabili e tossiche, oltre che rischi di tipo meccanico ed elettrico. Sebbene tutti risultino importanti, il rischio legato alla presenza di agenti biologici, che ha suscitato grande apprensione agli inizi degli anni '80 con la comparsa dell'AIDS (4), è tornato prepotentemente alla ribalta allorché si sono verificati due incidenti di laboratorio (Singapore, Taiwan) che hanno visto coinvolto il virus della SARS (5, 6). A distanza di alcune settimane da quando l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato interrotta la catena di trasmissione interumana del suddetto virus, si sono registrati altri due casi di infezione (Istituto Nazionale di Virologia di Pechino), a danno di ricercatori che hanno sviluppato la patologia tra la fine di marzo e la metà di aprile del 2004 (7). Ciò sottolinea la necessità di applicare le norme e le linee guida prodotte per tutelare la salute e sicurezza dei lavoratori impegnati in tale settore nonché di impiegare sistemi di sicurezza più stringenti nei laboratori che lavorano in situazioni particolari o di emergenza, come ribadito dall'OMS nel caso del Coronavirus responsabile della SARS (8).

Infezioni occupazionali contratte in laboratorio

a. Definizione

Un'infezione occupazionale viene classificata come *acquisita in laboratorio* allorché risulti correlata all'attività lavorativa del laboratorista. Non sempre è facile risalire all'origine occupazionale d'infezione. Il dubbio non sussiste nel caso di un'infezione da patogeni non presenti o rari in ambito comunitario (ad esempio: Sabia virus) che si presenti in un laboratorista che stia lavorando con quel microrganismo (9); la questione si complica nel caso sia dovuta ad un microrganismo presente anche nella comunità (come i virus epatitici, il bacillo tubercolare, l'HIV).

Sono stati proposti alcuni criteri per inquadrare un'infezione come acquisita in laboratorio:

- **criterio spaziale:** i) aver lavorato con un microrganismo presente solo in laboratorio e non in ambito ospedaliero (infezione occupazionale certa/probabile); ii) aver lavorato con microrganismi, presenti anche in comunità, dello stesso tipo di quelli causa dell'infezione in atto (infezione occupazionale probabile/possibile); iii) aver lavorato in un laboratorio dove si è verificato nello stesso periodo un focolaio epidemico causato dallo stesso microrganismo (infezione occupazionale certa/probabile);
- **criterio causale:** aver riportato un incidente occupazionale nel corso di un lavoro con microrganismi dello stesso tipo di quelli causa dell'infezione in atto (infezione occupazionale certa/probabile);
- **criterio temporale:** avere una sierconversione o, in caso di infezione tubercolare, una cuticonversione a seguito dell'incidente occupazionale (infezione occupazionale certa);
- **criterio microbiologico:** il microrganismo ha le stesse caratteristiche di quello con il quale il laboratorista ha lavorato o sta lavorando (antibiogramma, identificazione del sierotipo o del genotipo...) (infezione occupazionale certa/probabile).

Per riconoscere l'origine occupazionale inoltre l'infezione non deve essere in atto, in incubazione o pregressa al momento dell'assunzione (10).

b. Dati epidemiologici

In letteratura già alla fine del 1800 venivano riportati episodi di infezioni contratte in laboratorio: nel 1885, a cinque anni di distanza dalla scoperta della Salmonella come responsabile delle infezioni tifiche e paratifiche, il servizio imperiale tedesco della sanità evidenziava due casi di febbre tifoide contratta nel corso del lavoro. Nel 1893 un altro caso di febbre tifoide, acquisita in laboratorio, fu scoperto in Germania ed un caso di tetano in Francia. Nel 1903 fu osservato il primo caso di blastomicosi determinata da autoinoculazione accidentale (11).

Nel 1941, Meyer ed Eddie pubblicarono il risultato di un'indagine effettuata negli Stati Uniti su 74 infezioni da brucellosi contratte in laboratorio, giungendo alla conclusione che la manipolazione di colture o l'inalazione di polvere contenente la Brucella erano pericolose per i tecnici di laboratorio (12).

Sulkin e Pike nel 1949 pubblicarono la prima di una serie di ricerche sulle infezioni contratte in laboratorio, nella quale annoverarono 222 infezioni virali, 21 delle quali risultate fatali. Almeno in un terzo dei casi la fonte probabile di infezione era associata con la manipolazione di animali e/o tessuti infettati. Solo il 12% dei casi segnalati erano stati registrati (13). Nel 1951 da parte degli stessi autori è stata pubblicata una seconda indagine epidemiologica riguardante 1342 infezioni di laboratorio, verificatesi nel corso di venti anni (dal 1930 al 1950), delle quali 775 batteriche (57.7%), 265 virali (19.7%), 200 casi di rickettsiosi (14.9%), 63 casi di micosi (4.7%) e 39 parassitosi (2.9%). Gli agenti responsabili di brucellosi, tubercolosi, tularemia, tifo ed infezione streptococcica sono risultati causa del 31% delle infezioni (14). Questa indagine è stata aggiornata nel 1965 con l'aggiunta di 641 casi nuovi o precedentemente non riferiti (15) ed ulteriormente nel 1976, per un totale cumulativo di 3921 casi (16).

Nel 1967 Hanson e collaboratori hanno pubblicato un lavoro riguardante 428 infezioni determinate da arbovirus legate ad attività di laboratorio. L'esposizione ad aerosol infetti è stata considerata la più probabile fonte di infezione (17). Nel 1974 Skinholj rendeva noti i risultati di un'indagine riguardante il personale di laboratori di chimica clinica in Danimarca, ove si era segnalata un'incidenza di epatite sette volte superiore rispetto alla popolazione generale (2.3 casi all'anno/1000 laboratoristi) (18). Un'indagine simile effettuata nel 1976 in Inghilterra tra tecnici di laboratorio ha mostrato un rischio di acquisizione della tubercolosi cinque volte superiore rispetto alla popolazione generale (19).

La tabella I riassume casi di infezioni contratte in laboratorio tra il 1930 ed il 1961 (20) e le principali tipologie di laboratorio in cui si sono verificate sono riportate nella tabella II (21). Alcuni dei patogeni coinvolti in incidenti verificatisi negli ultimi anni in laboratorio, oltre al già citato SARS-CoV, sono elencati nella tabella III. L'incidente che ha visto il coinvolgimento del virus Sabia ha riguardato un virologo infettatosi mentre lavorava alla purificazione del medesimo, probabilmente a causa dell'emissione di aerosol derivante dalla rottura di una bottiglia contenen-

Tabella I. Casi di infezioni contratte in laboratorio negli anni 1930-1961

Malattia	Anno	n. casi
Psittacosi	1930	11
Brucellosi	1938	94
Febbre Q	1940	15
Tifo murino	1942	6
Febbre Q	1946	47
Coccidioidomicosi	1950	13
Istoplasmosi	1955	18
Encefalite venezuelana	1959	24
Tularemia	1961	5

da: Phillips GB, 1967, modificata (20).

Tabella II. Infezioni contratte da lavoratori suddivise per tipologia di laboratorio

	Numero	%
Ricerca	2307	58.8
Diagnostica	677	17.3
Farmaceutica	134	3.4
Didattica	106	2.7
Non specificati	697	17.8
TOTALE	3921	100

da: Collins CH, 1993, modificata (21).

Tabella III. Infezioni di laboratorio (anni 2000-2004) e patogeni coinvolti

	Agente biologico	Anno	Bibliografia
virus	Sabia	2001	(22)
	West Nile	2002	(23)
batteri	<i>Neisseria meningitidis</i>	2000	(24)
	<i>Bacillus anthracis</i>	2002	(25)
	<i>Brucella melitensis</i>	2004	(26)

te la coltura virale nel corso di una centrifugazione ad alta velocità (22). Altri due episodi hanno riguardato l'involontaria inoculazione di materiale biologico infettato dal virus West Nile (23). Relativamente alle infezioni batteriche, due microbiologi si sono infettati accidentalmente lavorando con colture di *N. meningitidis* (24); un altro laboratorista ha contratto carbonchio cutaneo dopo essersi infettato una ferita trasportando una provetta contenente ceppi di *B. anthracis* senza utilizzare guanti (25). Due casi di brucellosi verificatisi nel 2004 negli Stati Uniti hanno riguardato due laboratoristi infettatisi lavorando su bancone con emocolture positive per *Brucella melitensis* (26).

Riguardo alle infezioni parassitarie acquisite in laboratorio, una rassegna del 2001 (27) riporta circa 200 casi ascrivibili ai patogeni schematizzati nella tabella IV.

Tabella IV. Parassiti responsabili di infezioni contratte in laboratorio

Protozoi del sangue e dei tessuti	<i>Tripanosoma cruzi</i>
	<i>Toxoplasma gondii</i>
	<i>Plasmodium spp.</i>
	<i>Leishmania spp.</i>
	<i>Tripanosoma brucei subsp.</i>
Protozoi intestinali	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Isoospora belli</i>
	<i>Giardia lamblia</i>
Elminti	<i>Schistosoma spp.</i>
	<i>Strongyloides stercoralis</i>
	<i>Ancylostoma spp.</i>
	<i>Fasciola hepatica</i>

da: Herwaldt B, 2001, modificata (27).

c. Modalità di acquisizione

Numerose indagini epidemiologiche hanno evidenziato che gran parte degli incidenti verificatisi in laboratorio sono determinati dalla poca attenzione prestata dai lavoratori o dalla mancata applicazione di corrette procedure di sicurezza. Nei laboratori di analisi e di ricerca le principali vie di contaminazione (riepilogate nella tabella V) includono l'inalazione, il contatto cutaneo in presenza di tagli, ferite, abrasioni ed il contatto oculare per schizzi accidentali; l'inoculazione parenterale a seguito di punture o tagli con oggetti acuminati e/o taglienti; meno usuale è l'ingestione involontaria di agenti patogeni (pipettaggio a bocca, procedura non più praticata) (10, 28). Va ricordato che il contagio può causare infezione allorché l'agente patogeno sia presente in concentrazione pari almeno alla sua dose minima infettante e sussista un particolare stato di recettività dell'ospite.

La trasmissione per inalazione rappresenta la principale modalità di contagio nelle infezioni acquisite in laboratorio. Operazioni di laboratorio che richiedono l'im-

Tabella V. Modalità di acquisizione delle infezioni in laboratorio

Trasmissione	Esempio	Agenti responsabili
Inalazione	<ul style="list-style-type: none"> Aerosols contaminati prodotti da manovre che implicano apertura di contenitori e di colture liofilizzate, centrifugazione, pipettaggio, ecc. 	TBC, Brucelle, HIV
Inoculazione parenterale	<ul style="list-style-type: none"> Punture da aghi Tagli da oggetti acuminati e vetri rotti 	HIV, HBV, HCV, Leptospire, virus Ebola, ...
Contatto diretto con cute e/o congiuntive	<ul style="list-style-type: none"> Schizzi da separazione violenta di aghi e siringhe Trasporto di microrganismi alla congiuntiva tramite mani contaminate 	Brucelle, HBV, HIV, <i>S. typhi</i> , <i>N. meningitidis</i> , dengue, toxoplasmosi ...
Ingestione	<ul style="list-style-type: none"> Aspirazione di materiale contaminato Trasporto di microrganismi alla bocca tramite mani contaminate 	Salmonella, Shigelle, HAV, Brucelle ...
Contatto con animali da laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> Graffi, morsi, punture di artropodi 	Virus rabbia, Rickettsie, Herpesvirus simile di tipo B, ...

piego di una rilevante energia quali l'omogeneizzazione, la centrifugazione e il pipettaggio vigoroso sono in grado di generare aerosols inalabili. Si possono generare bioaerosol per l'uso improprio delle anse da batteriologia: un'ansa troppo lunga o con un occhiello troppo grande tende a disperdere nell'ambiente piccole goccioline contaminate da batteri. Anche un flambaggio non corretto o l'immersione di un'ansa incandescente in brodo di coltura possono comportare lo stesso fenomeno. Bioaerosols si formano con l'utilizzo di pipette e di siringhe (miscelazione; risospensione di microrganismi; espulsione a pressione di liquidi), l'apertura di provette e flaconi contenenti liquidi, l'utilizzo di vortex e la sonicazione. Il patogeno più di frequente responsabile di eventi infettivi a seguito delle suddette manovre è *M. tuberculosis* in quanto forma colonie secche che facilmente si disperdono nell'aria.

Il destino delle diverse goccioline di cui si compone il bioaerosol dipende dalla dimensione delle stesse: goccioline con diametro inferiore a 150 µm evaporano in meno di 2-3 secondi, prima di raggiungere il terreno, residuando droplet nuclei in grado di rimanere in sospensione per lunghi periodi ed essere trasportati dalle correnti d'aria generate dai sistemi di ventilazione e dal movimento delle persone. Gli aerosols prodotti a livello dei banchi di laboratorio possono essere dispersi anche dai Bunsen attraverso la creazione di correnti ascensionali. Il bioaerosol infetto è causa di infezioni unicamente se si deposita e permane all'interno dell'apparato respiratorio. Goccioline con diametro maggiore di 150 µm raggiungono invece il suolo, dove vanno a far parte della polvere ambientale o aderiscono alle superfici e risultano infettanti solo se i patogeni in esse contenuti sopravvivono sulle superfici ambientali per il tempo sufficiente a che un individuo contamina le proprie mucose toccando la superficie stessa (21).

Altre procedure lavorative o situazioni che possono rappresentare un rischio per i laboratoristi includono il lavoro con grandi volumi e/o concentrazioni di microrganismi (29), l'eccessivo affollamento di persone o attrezzature nel laboratorio, le infestazioni da roditori e insetti, l'accesso a persone non autorizzate. È opportuno precisare che con il progresso tecnico e la diffusione di microrganismi emergenti cambiano le modalità di infortunio che possono accadere in laboratorio.

Controllo delle infezioni contratte in laboratorio

a. Principali riferimenti normativi

Il rischio da agenti biologici si configura in qualunque tipo di laboratorio, sia esso didattico o di ricerca. Riguardo alla classificazione dei laboratori il DPR 14 gennaio 1997 classifica i laboratori suddividendoli in:

1. *laboratori generali di base: ad organizzazione semplice ed unitaria, svolgono indagini nell'ambito della biochimica clinica e tossicologica, dell'ematologia ed emocoagulazione, dell'immunoematologia, della microbiologia;*
2. *laboratori specializzati: esplicano indagini diagnostiche monospécialistiche ad elevato livello tecnologico e*

professionale nell'ambito della biochimica clinica e tossicologica, dell'ematologia ed emocoagulazione, dell'immunoematologia, della microbiologia, della virologia, della citoistopatologia, della biologia molecolare e della genetica;

3. *laboratori generali di base con settori specializzati: sono laboratori ad organizzazione complessa che, per carico di lavoro, per varietà di tipologia analitica e complessità dei quesiti diagnostici posti, necessitano di un'articolazione in unità operative o moduli specializzati e della disponibilità di tecnologie di livello superiore e di competenze professionali particolari. Possono svolgere indagini diagnostiche nell'ambito degli specifici settori di cui ai punti 1 e 2.*

"La tipologia di prestazioni eseguite nei diversi laboratori nonché la dotazione strumentale hanno un diverso grado di complessità commisurato alla realtà sanitaria e alla tipologia di quesiti diagnostici posti al laboratorio".

Un importante provvedimento legislativo atto a garantire la sicurezza dei lavoratori che prestano la propria opera all'interno dei laboratori è contenuto nel DM 28 settembre 1990. Emanato a seguito della comparsa sulla scena mondiale dell'epidemia di AIDS, tale decreto ha reso vincolanti le linee guida di comportamento per gli operatori sanitari per il controllo dell'infezione da HIV (emanate dalla Commissione Nazionale per la lotta contro l'AIDS del Ministero della Sanità il 6 settembre 1989) ed ha evidenziato l'obbligo di seguire una strategia di prevenzione globale, in riferimento alle "Precauzioni Universali" elaborate dai CDC di Atlanta (30, 31), basata sulla necessità di adottare specifiche misure di cautela nei confronti dell'esposizione a sangue e liquidi biologici. All'art.6 del su indicato decreto sono elencate precauzioni specifiche per i laboratori: *"Il personale ... deve adottare idonee misure protettive durante la manipolazione di campioni di sangue ed altri materiali biologici... (...). La gestione dei campioni clinici deve essere effettuata in modo da minimizzare la diffusione di materiali patologici per limitare la conseguente possibilità di contaminazione dell'operatore e dell'ambiente. (...) Le attività che comportano produzione di virus in concentrazioni elevate debbono essere eseguite in laboratori di sicurezza livello 3 della classificazione adottata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Per il pipettaggio è obbligatoria l'adozione di sistemi di tipo meccanico. (...) le apparecchiature debbono essere decontaminate prima di qualsiasi intervento di manutenzione o riparazione"*.

Il titolo VIII del D.Lgs 626/94 e successive modifiche ed integrazioni ha sancito l'adozione di misure di prevenzione organizzative e procedurali idonee per la tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori esposti ad agenti biologici e la loro formalizzazione in documenti. Il campo di applicazione comprende tutte le attività nelle quali vi è rischio di esposizione ad agenti biologici, sia quelle con uso deliberato di microrganismi che quelle in cui si configura un rischio potenziale di esposizione. L'all.IX include, tra le attività lavorative che possono comportare la presenza di agenti biologici, quelle effettuate nei laboratori clinici, veterinari e diagnostici, esclusi i laboratori di diagnosi microbiologica. Il documento

emanato dal Coordinamento tecnico per la prevenzione degli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano (32) include, tra i settori lavorativi con uso deliberato di agenti biologici, le Università e i Centri di ricerca (ricerca e sperimentazione di nuovi materiali e processi utilizzando agenti biologici, laboratori di microbiologia - diagnostica e saggio) e la sanità (ricerca e sperimentazione di nuovi metodi diagnostici, uso e sperimentazione di farmaci contenenti agenti biologici, laboratori di microbiologia, prove biologiche su animali e cellule). Il suddetto decreto impone di adempiere a tutta una serie di obblighi inerenti la valutazione del rischio, l'informazione e la formazione dei lavoratori, le notifiche all'autorità competente, la sorveglianza sanitaria, le specifiche misure di contenimento da adottare per le diverse aree di lavoro (33). In particolare la valutazione del rischio (art.78) deve tener conto del livello di pericolosità dell'agente biologico e della quantità di materiale manipolato, del procedimento lavorativo, del numero di persone coinvolte nell'attività e di tutte le misure di emergenza attuabili in caso di pericolo per il personale esposto. Le principali misure tecniche, organizzative e procedurali (art.79) devono comprendere: un'attenta progettazione dei processi lavorativi per ridurre o evitare l'uso di agenti patogeni nocivi e per diminuire il numero delle persone esposte; l'adozione di misure tecniche di protezione, collettive e individuali, e di misure igieniche per prevenire la propagazione accidentale di agenti biologici al di fuori del luogo di lavoro; la predisposizione di idonee procedure e di sistemi per la conservazione, manipolazione, raccolta, trasporto e smaltimento in sicurezza del materiale biologico utilizzato e per la verifica periodica dell'eventuale presenza di agenti patogeni. L'art. 82 tratta le misure specifiche per laboratori e stabulari: "...Nei laboratori comportanti uso di agenti biologici dei gruppi 2, 3 e 4 ai fini di ricerca, didattici o diagnostici e nei locali destinati ad animali da laboratorio deliberatamente contaminati con tali agenti, il datore di lavoro deve adottare idonee misure di contenimento in conformità all'All. XII". In linea generale l'uso di agenti biologici di gruppo 2 deve avvenire in aree di lavoro corrispondenti almeno al secondo livello di contenimento, di gruppo 3 in aree corrispondenti almeno al terzo livello di contenimento, di gruppo 4 al quarto livello di contenimento. È inoltre specificato che "nei laboratori comportanti 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 secondo livello di contenimento. Nei luoghi (...) in cui si fa uso di agenti biologici ma il cui uso può far sorgere un rischio grave per la salute dei lavoratori, il datore di lavoro adotta misure corrispondenti almeno a quelle del terzo livello di contenimento".

Il DM 5 agosto 1998, n. 363, all'art.2, comma 3, considera "...laboratori i luoghi o gli ambienti in cui si svolgono attività didattica, di ricerca o di servizio che comportano l'uso di macchine, di apparecchi ed attrezzature di lavoro, di impianti, di prototipi o di altri mezzi tecnici, ovvero di agenti chimici, fisici o biologici... I laboratori

si distinguono in laboratori di didattica, di ricerca, di servizio sulla base delle attività svolte e, per ognuno di essi, considerata l'entità del rischio, vengono individuate specifiche misure di prevenzione e protezione, tanto per il loro normale funzionamento che in caso di emergenza e misure di sorveglianza sanitaria". Inoltre al comma 4 del medesimo articolo è specificato che "oltre al personale docente, ricercatore, tecnico e amministrativo dipendente dell'Università, si intende per lavoratore anche quello non organicamente strutturato e quello degli enti convenzionati, sia pubblici che privati, che svolge l'attività presso le strutture dell'università, ... nonché gli studenti dei corsi universitari, i dottorandi, gli specializzandi, i tirocinanti, i borsisti ed i soggetti ad essi equiparati, quando frequentino laboratori didattici, di ricerca o di servizio e, in ragione dell'attività specificamente svolta, siano esposti a rischi individuati nel documento di valutazione".

b. Linee guida

Nell'ambito della tutela della salute e sicurezza dei lavoratori esposti ad agenti biologici l'adempimento agli obblighi legislativi può essere facilitato dall'adozione di linee guida. Secondo la definizione classica data nel 1982 dall'Istituto di Medicina (IOM) di Washington (USA) le linee guida sono "raccomandazioni di comportamento clinico, elaborate mediante un processo sistematico, con lo scopo di assistere medici e pazienti nel decidere quali siano le modalità assistenziali più appropriate in specifiche situazioni cliniche". Nella definizione va evidenziato il termine *processo sistematico*, ovvero non basato su opinioni personali ma su una ricerca completa di tutte le informazioni scientifiche rilevanti (*evidences*) in tema di una specifica tematica, le quali devono essere valutate criticamente in un contesto multidisciplinare. Negli ultimi anni la ricerca in campo medico e biologico ha prodotto una tale quantità di nuove conoscenze che è diventato difficile, anche per gli operatori del settore, adottare decisioni basate sulle prove scientifiche disponibili. Le linee guida potrebbero dunque rappresentare una soluzione al problema della mole degli studi originali disponibili e della loro corretta interpretazione. Ogni linea guida prodotta dovrebbe essere "letta" da parte degli utilizzatori mediante appositi strumenti che consentano di valutare i principali aspetti metodologici, la correttezza delle raccomandazioni e le loro diverse implicazioni, al fine di favorire una lettura più critica e consapevole. Un esempio di strumento di valutazione sotto forma di check-list è reperibile all'interno del Programma Nazionale per le linee guida (PNLG) (34). In Italia le linee guida sviluppate in medicina a partire dagli anni '90 hanno riguardato in particolare gli aspetti assistenziali e clinico-organizzativi. Recentemente tuttavia anche il settore della medicina del lavoro, per il continuo mutamento delle tecnologie, degli strumenti, degli ambienti, dei prodotti, dell'organizzazione del lavoro e di conseguenza dei rischi sanitari connessi all'attività lavorativa, ha avvertito la necessità di dotarsi di linee guida specifiche (35, 36).

L'avvicinamento delle mansioni e delle attività presenti in ambiente ospedaliero, inclusi i laboratori, può

essere una delle cause più frequenti di errore ed uno dei modi per ridurre la possibilità di accadimento di tali errori consiste nella codificazione dell'esecuzione delle attività. Con il termine *procedura* si intende una metodica di lavoro riguardante le attività intese come insieme di azioni da organizzare in uno spazio temporale definito che riconosce al suo interno ambiti di responsabilità, figure di riferimento ai vari livelli, strumenti operativi, fonti di dati ed informazioni (37). Il *protocollo* è strumento tecnico rigido (specifica livelli di qualità obbligatori da perseguire se non si vogliono ottenere risultati di qualità scadente) e come tale utilizzato per la specificazione sequenziale di atti tecnici. Si colloca all'interno di una procedura qualora ci sia la necessità di specificarne la sequenza, al fine di uniformare il comportamento degli operatori. Una procedura prima ed un protocollo dopo, redatti e condivisi da un gruppo di lavoro e modificati opportunamente all'occorrenza (ad esempio per l'acquisto di una nuova strumentazione), diventano uno standard operativo che non permette personalizzazioni del metodo di lavoro, riducendone i potenziali errori (38). Ciò garantisce la qualità del prodotto (il risultato di un'indagine diagnostica o di un esperimento) oltre che contribuire alla tutela della sicurezza del lavoratore. Nell'ambito dell'organizzazione del laboratorio anche il DPR 14 gennaio 1997 sottolinea che tra i requisiti minimi organizzativi "*devono esistere documenti di servizio (regolamenti interni o linee guida) per lo svolgimento delle principali attività di gestione, concordati con i servizi competenti*". (...) *Deve esistere un manuale delle procedure diagnostiche...*".

c. Buone prassi di laboratorio (BPL)

I principi di buona pratica di laboratorio sono stati concepiti all'inizio degli anni '70 con la duplice finalità di prevenzione delle frodi relativamente all'esecuzione di studi non clinici sulla sicurezza delle sostanze chimiche per l'uomo e per l'ambiente e di dimostrazione della credibilità e coerenza dell'informazione sperimentale prodotta dai Centri di saggio che tali studi intraprendono (39). L'all.I del D.Lgs 27 gennaio 1992, n.120, definisce buona pratica di laboratorio "*il processo di organizzazione e le condizioni in cui gli studi di laboratorio vengono programmati, eseguiti, controllati, registrati e resi noti*". L'all.II del medesimo decreto specifica che "*lo scopo di questi principi consiste nel promuovere lo sviluppo di dati sperimentali di buona qualità*". I principi della BPL sono stati rielaborati dall'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (40) alla fine del 1997 e adottati dalla Commissione Europea con le due Direttive 99/11/CE e 99/12/CE dell'8 marzo 1999, recepite nella nostra legislazione con il DM 5 agosto 1999.

La funzione che i principi di BPL hanno come insieme di regole, accettate a livello internazionale, tese ad assicurare la qualità dei dati sperimentali, attualmente si sta estendendo, come linea di principio, a molte discipline scientifiche. La maggior parte degli incidenti di laboratorio e delle infezioni che ne possono derivare sono causati da errori umani, tecniche di lavoro non corrette e uso errato delle apparecchiature. Nella tabella VI sono elencati i

metodi da adottare per evitare gli incidenti più frequenti derivanti da questi fattori. Nella tabella VII sono invece indicate le buone prassi riguardo l'utilizzo di strumentazione in laboratorio.

I principi di BPL costituiscono un sistema di qualità dedicato, applicato alle attività di sperimentazione non clinica destinate ad appurare la sicurezza delle sostanze chimiche. La gestione di tale sistema presuppone la sua connessione ad un sistema di qualità di base, riconosciuto ed approvato, dal quale attingere procedure di gestione comuni a tutti i sistemi di qualità, quali le norme ISO 9000, normalmente applicate a qualsiasi realtà produttiva. Un sistema di qualità così configurato può essere integrato con altri sistemi di qualità dedicati o con parte di essi, da cui ottenere criteri e procedure di gestione per specifici argomenti (41). Recentemente è stata pubblicata la norma ISO 15190: 2003 (Medical laboratories - requirements for safety) con lo scopo di prevenire le infezioni contratte dal personale di laboratorio e l'emissione accidentale di agenti potenzialmente dannosi per l'uomo, gli animali e le piante. Tale norma specifica i requisiti per creare e mantenere un ambiente di lavoro sicuro coprendo tutti gli aspetti di sicurezza di un laboratorio ed è destinata a tutti i laboratori di medicina, dai grandi centri di ricerca e studio ai piccoli laboratori e di settore. Va precisato che la norma non copre specifiche esigenze di laboratori specializzati nello studio di agenti infettivi che necessitano elevati livelli di protezione.

Aspetti inerenti la biosicurezza

a. Livelli di sicurezza biologica

Per lavorare in sicurezza all'interno dei laboratori è opportuno agire su più fronti. Innanzi tutto è fondamentale applicare le *buone tecniche microbiologiche*, le quali non possono essere sostituite dalle attrezzature specializzate perché queste fungono da supporto alle medesime. È inoltre necessario operare all'interno di *barriere primarie*, atte a garantire la protezione dei lavoratori (anche mediante la vaccinoprofilassi) e dell'ambiente confinato del laboratorio. Tale contenimento principale è raggiungibile mediante l'utilizzo di appropriati equipaggiamenti ed apparecchi di sicurezza e l'applicazione di norme comportamentali tecniche (uso di metodiche e di attrezzature, quali i contenitori di sicurezza per le centrifughe, in grado di ridurre la produzione di aerosol; uso corretto delle cappe biohazard e dei dispositivi di pipettaggio; uso sistemico dei dispositivi di protezione individuale - DPI...) ed igieniche (divieto di bere e mangiare durante l'attività lavorativa, corretta igiene delle mani, non indossare il camice al di fuori del laboratorio, non contaminare superfici ed oggetti utilizzati da altri...). Le barriere primarie da sole potrebbero essere non sufficienti, in caso di incidente, a prevenire la diffusione nell'ambiente di agenti patogeni, con conseguente rischio per la collettività. Allorché si opera con agenti biologici appartenenti ai gruppi 3 e 4 (secondo la classificazione del D.Lgs 626/94) occorre lavorare all'interno di *barriere secondarie*, ossia di ambienti concepiti appositamente per garantire la protezione dell'am-

Tabella VI. Tecniche di laboratorio sicure

MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI
<ul style="list-style-type: none"> - Contenitori: di vetro o plastica; robusti; senza perdite; etichettati correttamente; moduli di richiesta in buste separate - Trasporto al laboratorio: contenitori secondari autoclavabili o resistenti a disinfezione, con supporti per mantenere il campione in posizione verticale - Ricezione: in una zona dedicata - Apertura degli imballaggi: eseguita su vassoi da personale specializzato ed informato
USO DI PIPETTE E PROPIPETTE
<ul style="list-style-type: none"> - Mai pipettare a bocca; mai usare siringhe con aghi ipodermici come propipette - Pipette dotate di tamponi di cotone per ridurre contaminazione delle propipette - Mai soffiare aria in liquido contenente agenti infettivi - Mai mescolare materiali infetti tramite aspirazione ed espulsione alternate da una stessa pipetta - Non espellere a forza i liquidi dalle pipette - Panno o carta assorbente imbevuti di disinfettante stesi sul piano di lavoro per evitare dispersioni di materiale infetto per caduta accidentale di gocce dalla pipetta - Preferire pipette a caduta - Immersione di pipette contaminate in contenitori infrangibili contenenti disinfettanti appropriati
TECNICHE PER EVITARE DISPERSIONE DI MATERIALE INFETTO
<ul style="list-style-type: none"> - Anello dell'ansa completamente chiuso; asta non più lunga di 6 cm - Utilizzo di microinceneritore per sterilizzare l'ansa; preferire anse monouso - Test della catalasi eseguito in provetta o su vetrino con vetro di copertura - Colture e campioni da eliminare posti in contenitori a tenuta dotati di appositi sostegni - Decontaminazione aree di lavoro con adatti disinfettanti a fine sessione di lavoro
TECNICHE PER EVITARE INGESTIONE DI MATERIALE INFETTO E CONTATTO CON CUTE/MUCOSE
<ul style="list-style-type: none"> - Lavaggio frequente delle mani - Divieto di consumare e conservare cibi o bevande; divieto di truccarsi - Idonea protezione di viso e occhi
TECNICHE PER EVITARE INOCULAZIONE DI MATERIALE INFETTO
<ul style="list-style-type: none"> - Ridotto utilizzo di siringhe ed aghi - Utilizzo di pipette Pasteur in plastica morbida - Massima attenzione a vetri rotti o sbeccati
SEPARAZIONE DEI SIERI
<ul style="list-style-type: none"> - Divieto di pipettare a bocca - Pipette usate poste in disinfettante idoneo prima dell'eliminazione - Provette dei campioni scartati poste in contenitori adatti per essere autoclavate ed incenerite - Disponibilità di ipoclorito (preparato quotidianamente) per pulire schizzi e/o versamenti di sangue e siero
APERTURA DI FIALE CONTENENTI MATERIALI INFETTI LIOFILIZZATI
<p>Sempre aperte in cappa di sicurezza biologica. Procedura</p> <ul style="list-style-type: none"> - decontaminare superficie esterna - intaccare la fiala a metà del tampone di ovatta o cellulosa - tenere la fiala con un tampone di cotone (protezione delle mani) - per rompere il vetro appoggiare all'intaccatura ferro incandescente - rimuovere delicatamente la parte superiore (materiale infetto) - se il tampone di cotone rimane sopra il contenuto rimuoverlo con pinze sterili - aggiungere lentamente il liquido di risospensione (per evitare formazione di schiuma)
CONSERVAZIONE DI FIALE CONTENENTI MATERIALE INFETTO
<ul style="list-style-type: none"> - Mai immergerle in azoto liquido se rovinate o mal sigillate: rischio di esplosione alla rimozione - Per basse temperature conservarle nella fase gassosa dell'azoto liquido o in congelatori o in ghiaccio secco - Per la rimozione delle fiale indossare protezioni per gli occhi e per le mani - Disinfettare le superfici esterne delle fiale dopo rimozione dal luogo di conservazione

da: Manuale di biosicurezza in laboratorio, 1995, modificata (43).

Tabella VII. Buone prassi per l'uso di strumentazioni di laboratorio

CENTRIFUGHE
<ul style="list-style-type: none">- Funzionamento soddisfacente della meccanica- Posizionate ad altezza tale da vedere l'interno per l'inserimento dei campioni- Ispezione quotidiana di rotori e contenitori per accertare assenza di corrosioni e fessure capillari- Bilanciamento appropriato (utilizzo di propanolo al 70% per bilanciare contenitori)- Provette ben tappate e contenitori per centrifuga a tenuta
OMOGENIZZATORI, AGITATORI E SONICATORI
<ul style="list-style-type: none">- Tappi e contenitori privi di imperfezioni o distorsioni; guarnizioni mantenute in buono stato- Usare preferibilmente contenitori in PTFE (politetrafluoroetilene)- Apparecchi coperti durante l'uso con custodia in plastica disinfettabile: se possibile usarli sotto cappa di sicurezza- Protezioni acustiche per l'uso di sonicatori
FRANTUMATORI DI TESSUTI (PROVETTE DI GRIFFITH, FRANTUMATORI DI TENBROEK)
<ul style="list-style-type: none">- Preferibile l'uso di frantumatori in PTFE- Utilizzare sotto cappa di sicurezza
MANUTENZIONE E USO DI FRIGORIFERI E CONGELATORI
<ul style="list-style-type: none">- Periodicamente scongelati e puliti (utilizzo di protezioni per il viso e guanti di gomma pesante); dopo la pulizia disinfettare superficie interna- Corretta etichettatura dei contenitori- Non conservare soluzioni infiammabili in frigorifero

da: Manuale di biosicurezza in laboratorio, 1995, modificata (43).

biente esterno al laboratorio. Il contenimento secondario può essere raggiunto mediante soluzioni progettuali (filtrazione dell'aria, pressione ambientale) e procedurali (limitazione di accesso nelle aree lavorative, facilità di lavaggio delle mani, disponibilità di mezzi di disinfezione e sterilizzazione) idonee (42).

Come accennato in precedenza, per ogni gruppo di rischio il D.Lgs 626/94 individua specifici livelli di contenimento, per cui i laboratori sono definiti, sulla base delle loro caratteristiche progettuali e dotazioni di sicurezza, come:

laboratori di base - livello di biosicurezza 1 (BSL 1) e 2 (BSL2).

laboratorio di sicurezza - livello di biosicurezza 3 (BSL3)

laboratorio di massima sicurezza - livello di biosicurezza 4 (BSL4).

I livelli di biosicurezza riflettono il rischio di acquisizione di infezioni trasmesse per via aerea. Ad ogni aumento di livello corrisponde un aumentato rischio occupazionale ed è perciò associato a più rigidi controlli e pratiche di contenimento del rischio. Gli agenti biologici appartenenti ai gruppi 1 e 2 vengono generalmente manipolati nei laboratori di base. Il BSL 1 è raccomandato nel caso si manipolino agenti biologici che non sono associati ad infezioni (*Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*) (laboratori di didattica), per i quali è sufficiente rispettare i principi delle procedure di sicurezza standard. Il BSL 2 è raccomandato nei laboratori clinici quando il lavoro viene fatto con qualsiasi campione di sangue umano, fluido corporeo o tessuto dove la presenza di un agente infettante può risultare sconosciuta e nella maggior parte dei laboratori di microbiologia ospedaliera, dove si manipolano agenti biologici che non sono usualmente tra-

smessi per via aerea (patogeni enterici, HBV, HIV). Dal punto di vista della progettazione, rispetto al BSL 1 va precisato che arredi e finiture devono consentire operazioni di pulizia e disinfezione agevoli; per qualsiasi operazione che possa generare bioaerosol vanno utilizzate cappe di sicurezza biologica (cappe biohazard). Il BSL 3 è raccomandato per lavorazioni con agenti biologici trasmissibili per via aerea o responsabili di gravi patologie (*M. tuberculosis*, *Coxiella burnetii*...) o quando si manipolano grandi quantitativi di agenti biologici, per i quali in altre condizioni è previsto il BSL 2. Il laboratorio deve essere separato dagli altri locali da una "zona filtro" (ingresso a doppia porta) e all'interno il gradiente di pressione dell'aria deve essere negativo rispetto ai locali circostanti per impedire all'aria eventualmente contaminata di fuoriuscire verso zone non protette. L'aria immessa nel laboratorio può essere filtrata per garantire che sia "pulita"; tutta l'aria espulsa passa attraverso filtri HEPA. Il BSL 4 si applica quando si manipolano agenti biologici trasmissibili per via aerea e responsabili di malattie letali (virus Marburg...). Tutte le operazioni vanno condotte in cappe biohazard di classe III oppure di classe II se l'operatore indossa una tuta ventilata a pressione positiva.

La tabella VIII riassume le principali caratteristiche progettuali, di attrezzature e procedurali legate a ciascun livello (43, 44).

b. Cabine di sicurezza biologica

Le cappe o cabine di sicurezza biologica sono attrezzature che, scelte ed impiegate in modo corretto, agiscono come barriere primarie, eliminando o riducendo il rischio di infezioni trasmesse per via aerea ed impedendo la diffu-

Tabella VIII. Relazioni tra livelli di sicurezza, caratteristiche progettuali, attrezzature e procedure (elenco non esaustivo)

BSL	Progettazione	Attrezzature di biosicurezza	Procedure
2	<p>Spazi: ampi</p> <p>Muri, soffitti, pavimenti: lisci, facili da pulire, impermeabili ai liquidi, resistenti ad agenti chimici e disinfettanti</p> <p>Pavimenti: antiscivolo</p> <p>Tubature a vista: ben discoste dal muro</p> <p>Superfici orizzontali: evitate se possibile</p> <p>Illuminazione: adeguata, senza riflessi e luce troppo forte</p> <p>Superfici dei banconi: unite ai muri da sigillanti, resistenti ad acidi, calore...</p> <p>Mobilio: robusto, saldamente ancorato, facilmente pulibile</p> <p>Lavabi: vicino alla porta, acqua corrente</p> <p>Porte: antincendio, chiudibile da sé, pannelli per ispezione</p> <p>Finestre: apribili (in assenza di aerazione meccanica), reti contro insetti</p> <p>Sistemi di sicurezza: antincendio; impianto elettrico, illuminazione e docce di emergenza; lavaocchi</p>	<p>Cappe biohazard classe I o II (se rischio di aerosol; grandi volumi)</p> <p>Propipette</p> <p>Inceneritori per anse</p> <p>Provette e bottiglie con tappo a vite (per conservare campioni)</p> <p>Autoclavi: nel laboratorio o nello stesso edificio (per rifiuti)</p> <p>Pipette Pasteur in plastica</p> <p>DPI idonei</p>	<p>BTM ed inoltre:</p> <p>Simbolo di rischio biologico: esposto sulla porta</p> <p>Divieto di: pipettare a bocca, mangiare, bere, fumare, conservare cibo, portare oggetti alla bocca, applicare cosmetici</p> <p>Pulizia e ordine</p> <p>Superfici di lavoro: decontaminate dopo versamento di materiali e a fine giornata</p> <p>Lavaggio delle mani</p> <p>Procedure tecniche: minimizzare formazione di aerosol e goccioline</p> <p>Camici, grembiuli, uniformi: indossati solo in laboratorio, riposti in appositi armadietti</p> <p>Accesso ad esterni: limitato</p> <p>Controllo roditori e artropodi</p> <p>Specifiche per disinfezione</p> <p>Porte: chiuse durante il lavoro</p>
3	<p><i>BSL 2 ed inoltre:</i></p> <p>Laboratorio: separazione fisica da corridoi di accesso</p> <p>Ingresso: a doppia porta</p> <p>Mezzi idonei per: evitare l'ingresso di insetti e artropodi</p> <p>Porte: presenza di serrature con chiave</p> <p>Stanza del laboratorio: sigillabile per decontaminazione</p> <p>Condotte dell'aerazione: devono permettere disinfezione tramite gas.</p> <p>Finestre: chiuse e sigillate</p> <p>Lavabi: azionabili a pedale o a gomito</p> <p>Impianto di aerazione: aria diretta dall'esterno all'interno del laboratorio (pressione negativa all'interno). Aria può venire ricondizionata e ricircolata entro il laboratorio</p> <p>Impianto idrico: impediti flussi di ritorno</p>	<p><i>BSL 2 ed inoltre:</i></p> <p>Cappe biohazard classe I o II</p> <p>Cappe biohazard classe III (se del caso)</p>	<p><i>BSL 2 ed inoltre:</i></p> <p>Regola delle "due persone" (non rimanere da soli)</p> <p>Simbolo di rischio biologico: identificazione agenti biologici</p>
4	<p><i>BSL 3 ed inoltre:</i></p> <p>Laboratorio: isolato o in edificio separato</p> <p>Accesso controllato: ingresso e uscita tramite vestibolo a tenuta d'aria o doppia porta</p> <p>Sistema di aerazione controllato: impianto meccanico individuale con flusso diretto all'interno filtrato HEPA e sistema di scarico filtrato HEPA in uscita e, se del caso, in entrata</p> <p>Liquidi di scarico: tutti decontaminati</p>	<p><i>BSL 3 ed inoltre:</i></p> <p>Autoclavi passanti a doppia apertura (per sterilizzazione rifiuti e materiali)</p> <p>Cappe biohazard classe III</p> <p>Tute ventilate a pressione positiva (e doccia chimica per decontaminazione)</p>	<p><i>BSL 3 ed inoltre:</i></p> <p>Decontaminazione di tutti i materiali in uscita</p>

BSL = livello di biosicurezza; BTM = buona tecnica microbiologica

da: Laboratory Biosafety Manual, 2004, modificata (44).

sione di aerosol e degli schizzi verso l'operatore e l'ambiente esterno; possono anche garantire la sicurezza del campione biologico prevenendo contaminazioni esterne o crociate. Sono considerate dispositivi di protezione collettiva e come tali da utilizzare in modo prioritario rispetto alle misure di protezione individuale (art. 3 D.Lgs 626/94).

La filtrazione dell'aria rappresenta il metodo principale per l'abbattimento della contaminazione microbiologica. Il filtro assoluto HEPA (High Efficiency Particulate Air Filter) è formato da un sottile foglio di fibra di vetro (bo-

rosilicati) finemente pieghettato, capace di trattenere oltre il 99.97% delle particelle con diametro uguale o maggiore di 0.3 µm, il che equivale a trattenere la maggior parte dei patogeni. Il filtro HEPA ha anche la capacità di raddrizzare il flusso di aria che lo attraversa alla velocità di 0.45 m/sec, creando un flusso di aria laminare, cioè unidirezionale e privo di turbolenze. Ancora più selettivi sono i filtri ULPA (Ultra Low Penetration Air Filter) con efficienza di ritenzione del 99.99% per particelle di diametro variabile da 0.1 a 2.2 µm (28).

Le cappe biohazard si distinguono in 3 classi principali sulla base dello schema di funzionamento:

Classe I - cappa ventilata aperta frontalmente, è garantita la *protezione dell'operatore* mediante un flusso d'aria entrante *ma non del prodotto* in quanto l'aria in entrata non è filtrata. È dotata di filtro HEPA sul canale di espulsione dell'aria. Può essere utilizzata per agenti biologici a basso rischio (classe 1 e 2) ed allorché si compiono operazioni che non richiedono protezione del prodotto, ad esempio l'apertura di campioni biologici.

Classe II - cappa a flusso laminare verticale, aperta frontalmente, progettata per la *protezione dell'operatore, dei prodotti* al suo interno e *dell'ambiente circostante*. Il flusso d'aria all'interno della zona di lavoro passa preventivamente attraverso un filtro HEPA; un secondo filtro HEPA è utilizzato per l'aria uscente. È il tipo di cappa maggiormente utilizzato per la protezione dei lavoratori esposti al rischio biologico in laboratorio. Il flusso laminare e l'apertura frontale sono comuni a tutte le cappe di classe II; in funzione dell'aerodinamica interna (percentuale di aria riciclata o espulsa) esistono 4 principali varianti:

classe II A: il 70% dell'aria viene fatta ricircolare, il 30% viene espulsa. Utilizzata per microrganismi con rischio basso o moderato (classe 1 e 2), ma anche per piccole quantità di agenti chimici tossici non volatili e radio-nuclidi in tracce (eventualmente presenti in colture cellulari o sistemi microbici).

classe II B1: il 30% dell'aria viene fatta ricircolare, il 70% scaricata direttamente dalla superficie di lavoro tramite un condotto posto sul retro della cappa. Adatta ad agenti biologici di medio rischio (classi 2 e 3) e maggiori quantità di sostanze tossiche, volatili o radioattive rispetto alla classe precedente.

classe II B2: tutta l'aria viene eliminata (0% di ricircolo). È indicata per patogeni di classe 2 e 3 e per colture cellulari trattate con sostanze cancerogene e/o mutagene o marcate con isotopi radioattivi. Possono essere usate quando è richiesta la manipolazione di piccole quantità di sostanze chimiche volatili in studi microbiologici.

classe II B3: il 70% dell'aria viene fatta ricircolare, il 30% espulsa ed inviata all'esterno del laboratorio

Classe III - cappa ventilata, totalmente chiusa e a tenuta statica. L'aria entra attraverso un filtro HEPA e fuoriesce passando per due filtri HEPA posti in serie. Il lavoro viene svolto con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa. È utilizzata per lavorare con microrganismi ad alto rischio (classe 4) in quanto fornisce una barriera totale tra l'operatore ed il prodotto.

Il piano di lavoro delle cappe può essere di 2 tipi: *forrellinato*, maggiormente diffuso nel continente europeo, offre le migliori caratteristiche di laminarità dato che, in ogni punto del piano, il flusso d'aria scende verticalmente. Risulta particolarmente indicato allorché si lavori con colture cellulari e per tutte le applicazioni in cui sia utile garantire la sterilità al prodotto preservandolo anche da contaminazioni crociate (prodotto-prodotto). Il piano di lavoro *chiuso*, diffuso prevalentemente negli Stati Uniti, previene la contaminazione della cappa in caso di rovesciamento di liquidi, essendo possibile coprire il piano con teli assorbenti senza alterare il flusso d'aria. È tuttavia ri-

chiesta una manualità più complessa per prevenire le contaminazioni cosiddette "da monte" del prodotto, dovute a particelle contaminanti provenienti da oggetti già investiti dal flusso d'aria.

Per l'efficacia di contenimento del bioaerosol è di fondamentale importanza il rispetto di norme tecniche riguardanti la descrizione dei requisiti, le caratteristiche costruttive, i sistemi di controllo, i test da effettuare al momento dell'installazione e come controllo periodico, attestate con certificazione di conformità. Le cappe biohazard di classe II sono certificate secondo gli standard europei EN 12469, BS 55726, DIN 12950, in base alle norme americane NSF 49, alle australiane AS 2252 ed altre.

Dopo l'installazione della cappa deve essere instaurato un programma di manutenzione periodica conforme alla normativa di riferimento della cappa o dell'impianto. I test sui filtri, in conformità alle certificazioni già citate, vanno effettuati previa decontaminazione con formaldeide gassosa o vapore di perossido di idrogeno, almeno una volta all'anno, ad ogni loro sostituzione e trasferimento. L'intasamento dei filtri determina la diminuzione dell'efficacia di aspirazione e conseguentemente la protezione per l'operatore. È necessario inoltre controllare sempre la velocità dell'aria, l'integrità del filtro, la direzione del flusso d'aria nella barriera frontale e la classe di contaminazione (28, 45, 46).

Devono inoltre essere predisposte chiare procedure per l'uso e la disinfezione delle cappe. Riguardo la pulizia della cappa, il piano di lavoro, le pareti interne e il lato interno del vetro andrebbero puliti con etanolo al 70%, ipoclorito di sodio allo 0.05% o altri disinfettanti in funzione del tipo di attività condotta e/o di microrganismi presenti. Le cappe possono essere dotate di lampade UV ad azione germicida, le quali tuttavia non possono sostituire la quotidiana disinfezione delle superfici dal momento che le radiazioni ultraviolette operano solo in linea retta ed hanno un'efficacia limitata (per modificazione della lunghezza d'onda dopo riflessione sulle pareti metalliche). Tali lampade devono essere pulite di frequente per rimuovere polvere o sporco che potrebbero bloccare l'azione della luce ultravioletta. Andrebbe anche controllata periodicamente l'emissione della radiazione. La tabella IX dettaglia alcune indicazioni sull'utilizzo della cappa secondo le buone prassi di laboratorio (43, 47).

c. Dispositivi di protezione individuale

"Si intende per dispositivo di protezione individuale (DPI) qualsiasi attrezzatura destinata ad essere indossata e tenuta dal lavoratore allo scopo di proteggerlo contro uno o più rischi suscettibili di minacciarne la sicurezza o la salute durante il lavoro, nonché ogni complemento o accessorio destinato a tale scopo" (art. 40 D. Lgs 626/94). Un DPI deve essere predisposto per proteggere il lavoratore dallo specifico rischio presente nell'ambiente di lavoro ed alla base della scelta del medesimo deve esserci la valutazione dei rischi. "I DPI devono essere impiegati quando i rischi non possono essere evitati o sufficientemente ridotti da misure tecniche di prevenzione, da mezzi di protezione collettiva, da misure, metodi o procedimenti di riorganizzazione del lavoro" (art. 43 D. Lgs

Tabella IX. Cabine di sicurezza biologica e buone prassi

Utilizzo spiegato a tutti gli utenti
Lampada UV sempre spenta in presenza dell'operatore
Vetro frontale, se a scorrimento, posizionato ad altezza di sicurezza per l'operatore
Attrezzature e materiali all'interno ridotti al minimo e posti in fondo; vassoi contenenti disinfettanti idonei per posare pipette utilizzate
Non usare becco Bunsen (calore: scompensi nel flusso d'aria; danneggiamento dei filtri)
Operazioni eseguite nel mezzo o in fondo alla superficie di lavoro, visibili dal pannello di vetro
Non disturbare il flusso d'aria introducendo e togliendo ripetutamente le braccia; non inserire altro materiale a lavoro iniziato
Lasciare libere da oggetti grate di ingresso dell'aria su piano e pareti
Passaggio di persone alle spalle dell'operatore ridotto al minimo
Accendere motoventilatore 10 minuti prima di iniziare a lavorare (per stabilizzare il flusso)
Lasciare cappa in funzione 25-30 minuti dopo la disinfezione (trattamento di tutta l'aria)
Rimuovere immediatamente rovesciamenti o fuoriuscite di materiale biologico
Materiale potenzialmente infetto o contaminato estratto dalla cappa in contenitori chiusi puliti all'esterno ed etichettati; sacchetti autoclavabili chiusi all'interno della cappa; apparecchiature disinfettate prima della rimozione
Pulizia e disinfezione effettuate ogni volta a fine lavoro

da: Primary containment for biohazard: selection, installation and use of biological safety cabinets, 2000, *modificata* (47).

626/94). La scelta dei DPI presuppone quindi una forte correlazione con gli elementi centrali del D.Lgs 626/94, il quale regola gli obblighi del datore di lavoro in materia di gestione dei medesimi. L'art.42 menziona il D.Lgs 475/92 per quanto concerne la conformità alle norme (progettazione e costruzione) (48).

In tutte quelle attività di laboratorio in cui si può avere contaminazione con spruzzi, aerosol o schizzi di liquidi biologici possono essere utilizzati dispositivi di protezione per le vie respiratorie, per gli occhi, per le mani e per il corpo. Tutti devono avere marcatura CE, ottemperare a specifiche norme tecniche ed essere classificati come DPI in III categoria. I DPI delle vie respiratorie sono indicati quando vi è rischio di inalazione di materiale infetto, al fine di proteggere l'operatore da patologie trasmissibili per via aerea. La scelta del DPI (faciale filtrante) dipende essenzialmente dalla dimensione delle particelle infettanti aerodisperse e dalle caratteristiche dell'agente biologico e va fatta, in ogni singola situazione, sulla base della valutazione dei rischi, tenendo in considerazione anche il grado di comfort dell'utilizzatore. Devono essere conformi alla norma tecnica EN 149. I dispositivi di protezione del volto, del tipo a visiera o equivalente, devono ottemperare alla norma tecnica EN 166. I DPI per la protezione delle mani comprendono i guanti, conformi ai requisiti della norma tecnica EN 374. I guanti utilizzati per prevenire la contaminazione da agenti biologici sono prevalentemente di lattice, recentemente vengono prodotti in nuovi materiali (ad esempio in nitrile) da utilizzare soprattutto per soggetti sensibilizzati al lattice. Va ribadito che in nessun caso l'uso dei guanti è sostitutivo delle corrette procedure di igiene delle mani. I dispositivi per la protezione del corpo comprendono indumenti conformi alla nor-

ma EN 14126 e possono essere di diversa tipologia (tuta, camice) in relazione alle modalità lavorative ed alle mansioni da espletare (49).

d. Vaccinoprofilassi

Il D.Lgs 626/94 sancisce che il ruolo del datore di lavoro, di concerto con il medico competente, comprende l'esecuzione della valutazione dei rischi, da cui discende l'adozione di mezzi di prevenzione adeguati al tipo di esposizione individuata. Lo strumento preventivo più efficace nei confronti di agenti patogeni viventi risulta essere la vaccinazione. L'art.86 afferma che se esiste un vaccino efficace e sicuro contro un qualsiasi agente patogeno, deve essere offerto al lavoratore che per motivi professionali sia esposto a tale rischio. L'allegato XI del suddetto decreto, integrato con il DM 12 novembre 1999, individua tra l'altro gli agenti biologici per i quali è disponibile un vaccino efficace. La direttiva 2000/54/CE dispone che la vaccinazione non debba comportare oneri finanziari per i lavoratori e che essi vengano informati circa vantaggi ed inconvenienti sia della vaccinazione che della non vaccinazione (Allegato VII - Codice di condotta raccomandato per la vaccinazione).

Il medico competente deve dunque inserire nell'ambito della sorveglianza sanitaria un adeguato protocollo vaccinale. Per i laboratoristi dovrebbero essere raccomandate la vaccinazione anti-epatite B e anti-influenzale; per gli addetti ai laboratori di microbiologia, oltre a queste, anche la vaccinazione contro la tubercolosi ed il tifo (vaccino anti-tifico iniettabile polisaccaridico da antigene Vi) (50). Andrebbero inoltre prese in considerazione vaccinazioni per specifici agenti biologici per coloro che lavorano con tali patogeni, quali ad esempio *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, virus della rabbia... (44, 51).

Riferimenti legislativi

- Commissione nazionale per la lotta contro l'AIDS del Ministero della Sanità - Linee guida di comportamento per gli operatori sanitari per il controllo dell'infezione da HIV (6-09-1989).
 - Decreto Ministeriale 28 settembre 1990 - Norme di protezione dal contagio professionale da HIV nelle strutture sanitarie ed assistenziali pubbliche e private (G.U. n. 235 del 8-10-1990).
 - Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 120 - Attuazione delle direttive n. 88/320/CEE in materia di ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio (G.U. n. 40 del 18-02-1992).
 - Decreto Legislativo 4 dicembre 1992, n. 475 - Attuazione della direttiva 89/686/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1989, in materia di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi di protezione individuale (G.U. n. 289 del 9 dicembre 1992, Supplemento Ordinario).
 - Decreto Legislativo 19 settembre 1994, n. 626 - Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/655/CEE, 89/656/CEE, 90/629/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE, 90/679/CEE, riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro (G.U. n. 265 del 12-11-1994).
 - Decreto Legislativo 19 marzo 1996, n. 242 - Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 19 Settembre 1994 n. 626, recante attuazione di direttive comunitarie riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro (G.U. n. 104 del 6-05-1996).
 - Decreto del Presidente della Repubblica 14 gennaio 1997 - Approvazione dell'atto di indirizzo e coordinamento alle regioni e alle province autonome di Trento e di Bolzano, in materia di requisiti strutturali, tecnologici ed organizzativi minimi per l'esercizio delle attività sanitarie da parte delle strutture pubbliche e private (G.U. n. 42 del 20 febbraio 1997, Supplemento Ordinario).
 - DM 5 agosto 1998, n. 363 - Regolamento recante norme per l'individuazione delle particolari esigenze delle università e degli istituti di istruzione universitaria ai fini delle norme contenute nel D.Lgs 626/94 e successive modifiche ed integrazioni (G.U. n. 246 del 21-10-1998).
 - Decreto 5 agosto 1999 - Ministero della Sanità - Disposizioni relative all'ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio in recepimento delle direttive 1999/11/CE e 1999/12/CE (G.U. n. 241 del 13-10-1999).
 - Decreto Legislativo 19 giugno 1999, n. 229 - Norme per la razionalizzazione del Servizio Sanitario Nazionale, a norma dell'art.1 della legge 30 novembre 1998, n. 419 (G.U. n. 165 del 16 luglio 1999, Supplemento Ordinario).
 - Decreto del Ministero del Lavoro e della Previdenza Sociale del 12 novembre 1999 - Modificazioni all'allegato XI del Decreto Legislativo 19 settembre 1994, n. 626, recante attuazione di direttive comunitarie riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro (G.U. n. 21 del 27 gennaio 2000).
 - Direttiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 settembre 2000 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.
- 7) www.ccm.ministerosalute.it/ccm/ccmNews.jsp?id=12&men=inf&label=malattie-sars&lingua=italiano
 - 8) www.who.int/csr/sars/biosafety2003_12_18/en/
 - 9) Gandsman EJ, Aaslestad HG, Ouimet TC, Rupp WD. *Sabia virus incident at Yale University. Am Ind Hyg Assoc J* 1997; 58: 51-53.
 - 10) Ippolito G, Petrosillo N. Il rischio di infezioni occupazionali in laboratorio con particolare riferimento all'HIV e misure di prevenzione. In: *Manuale di laboratorio per la diagnosi delle infezioni opportunistiche*. Roma, Pensiero Scientifico Ed. 1995; 127-150.
 - 11) Messineo A. Prevenzione e sicurezza nei laboratori microbiologici. In: *Melino C, Messineo A, Rubino S. L'ospedale. Igiene, prevenzione e sicurezza*. SEU Ed. 2001.
 - 12) Meyer KF, Eddie B. Laboratory infections due to Brucella. *J Infect Dis* 1941; 68: 24-32.
 - 13) Sulkin SE, Pike RM. Viral infections contracted in the laboratory. *New Engl J Med* 1949; 241: 205-213.
 - 14) Sulkin SE, Pike RM. Laboratory-acquired infections. *J Am Med Assoc* 1951; 147: 1740-1745.
 - 15) Pike RM, Sulkin SE, Schulze ML. Continuing importance of laboratory-acquired infections. *Am J Public Health Nations Health* 1965; 55: 190-199.
 - 16) Pike RM. Laboratory associated infection: summary and analysis of 3921 cases. *Health Lab Sci* 1976; 13: 105-114.
 - 17) Hanson RP, Sulkin SE, Beuscher EL, Hammon WM, McKinney RW, Work TH. Arbovirus infections of laboratory workers. *Science* 1967; 158: 1283-1286.
 - 18) Skinhoj P. Occupational risks in Danish clinical chemical laboratories. II. Infections. *Scand J Clin Lab Invest* 1974; 33: 27-29.
 - 19) Harrington JM, Shannon HS. Incidence of tuberculosis, hepatitis, brucellosis and shigellosis in British medical laboratory workers. *Br Med J* 1976; 1: 759-762.
 - 20) Phillips GB. Prevention of laboratory-acquired infections. In: *The Chemical Rubber Co Ed. Handbook of laboratory safety*. Cleveland, 1967, 384-391.
 - 21) Collins CH. *Laboratory-acquired infections*. London, Butterworth Ed. 1993.
 - 22) <http://www2.umdj.edu/eohssweb/aiha/accidents/topic.htm>
 - 23) Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-acquired West Nile Virus infections. *MMWR* 2002; 51: 1133-1135.
 - 24) Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory-Acquired Meningococcal Disease. *MMWR* 2002; 51: 141-144.
 - 25) Centers for Disease Control and Prevention. Suspected cutaneous anthrax in a laboratory worker. *MMWR* 2002; 51: 279-281.
 - 26) Novello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, De Angelis K, Cain L, Wallace B, Dumas N. Laboratory-acquired Brucellosis. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1848-1850.
 - 27) Herwaldt B. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 659-688.
 - 28) Villa L. La protezione ambientale in base ai livelli di biosicurezza. *Atti del Seminario Nazionale La protezione collettiva ed individuale (DPI) nella sanità: rischi biologici e chimici*. Sondrio 8-9 ottobre 1999, 158-170.
 - 29) Centers for Disease Control and Prevention. Occupationally acquired human immunodeficiency virus infections in laboratories producing virus concentrates in large quantities: conclusions and recommendations of an expert team convened by the Director of the National Institutes of Health (NIH) reported by Division of Safety, National Institutes of Health. *MMWR* 1998; 37 (S-4): 19-22.
 - 30) Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987; 36 (2S): 3s.
 - 31) Centers for Disease Control and Prevention. Perspectives in disease prevention and health promotion update: Universal Precautions for prevention of transmission of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR* 1988; 37: 377.
 - 32) Coordinamento delle Regioni e delle Province Autonome di Trento e Bolzano. *Linee guida per l'applicazione del D.Lgs 626/94 (versione definitiva del 22/4/1996)*.
 - 33) Sardelli P, Marmo C, Giovanetti GA, Pelosi FM, Squillante S. La medicina del lavoro nei laboratori di microbiologia: esperienza della Asl Na 1 e Na 2. *Folia Med*. 2000; 71: 837-841.

Bibliografia

- 1) Società Italiana Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale. *Linee guida per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori della sanità esposti a rischio biologico*. Series Editors: Apostoli P, Imbriani M, Soleo L, Abbritti G, Ambrosi L. Volume 17/2005.
- 2) Sewell LD. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 389-405.
- 3) www.assiatel.it/problemi%20dell'ordine.htm
- 4) Petrosillo N, Puro V, De Carli G, Ippolito G and the SIROH Group. Risk faced by laboratory workers in the AIDS era. *J Biol Regul Homeost Agent* 2001; 15: 243-248.
- 5) Normile D. SARS experts want labs to improve safety practices. *Science* 2003; 302: 31.
- 6) Normile D. Second lab accident fuels fears about SARS. *Science* 2004; 303: 26.

- 34) www.pnlg.it
- 35) Franco G. Dall'evidenza scientifica alla pratica operativa: verso un modello di Medicina del lavoro basata su prove di efficacia. *Med Lav* 2001; 92: 159-165.
- 36) <http://www.pnlg.it/news/news0021.php>.
- 37) Galizio M, Resta D, Russo A. I protocolli come strumento di prevenzione. Metodi di costruzione e strategie applicative. *Quaderni ANIPIO* 1995, 2: 36-38.
- 38) Tartaro D. Protocolli operativi: cenni generali ed alcuni suggerimenti. In: Tartaro D, Sarti G. *Il processo di sterilizzazione*. Milano, Masson Ed. 1999
- 39) Caroli S. Prefazione. *Ann Ist Super Sanità* 2002; 38: 2.
- 40) www.oecd.org
- 41) Invernizzi E. Compatibilità di diversi sistemi di qualità. *Ann Ist Super Sanità* 2002; 38: 47-51.
- 42) Vaiani R. Modalità di utilizzo della protezione individuale e collettiva in laboratorio: rischio biologico. *Atti del Seminario Nazionale La protezione collettiva ed individuale (DPI) nella sanità: rischi biologici e chimici*. Sondrio, 8-9 ottobre 1999, 199-210.
- 43) *Manuale di biosicurezza in laboratorio*. *Ann Ist Super Sanità* 1995; 31 (Suppl. al n. 2): 1-122.
- 44) World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd edition, 2004.
- 45) Zanetti C, Zulian R. Una cappa biohazard per il laboratorio sicuro. *Ambiente & Sicurezza sul Lavoro* 2003; 3: 49-54.
- 46) Ferrario M. Le cappe biohazard: principi di funzionamento, norme tecniche di riferimento, corretto utilizzo. *Atti del Congresso Nazionale Il rischio biologico nelle strutture socio-sanitarie pubbliche e private*. Abano Terme (PD), 10-11 maggio 2001.
- 47) U.S. Department of Health and Human Services. *Primary containment for biohazard: selection, installation and use of biological safety cabinets*. Washington, U.S Government Printing Office, 2000.
- 48) Garlanda P, Ravanelli PL, Tallone M. *I dispositivi di protezione individuale in ambiente sanitario*. Verona, Vincenti Audiovisivi Editore, 1997.
- 49) *Linee Guida per la scelta e l'impiego di indumenti per la protezione da agenti biologici* - ISPESL, Dipartimento Igiene del Lavoro.
- 50) Anzelmo V, Bianco P, Castellino N. *Le vaccinazioni negli ambienti di lavoro - manuale operativo per il medico competente*. Roma, CIC Edizioni Internazionali, 2002.
- 51) Centers for Disease Control and Prevention. *Immunization of health-care workers: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. *MMWR* 1997; 46 (RR-18): 1-42.

Richiesta estratti: Nicoletta Vonesch - ISPESL - Dipartimento Medicina del Lavoro - Via Fontana Candida, 1 - 00040 Monteporzio Catone (RM), Italy