

## Il rischio da agenti biologici

- La legislazione
- Norme di comportamento
- La gestione dei rifiuti
- In caso di emergenza
- Le cappe di sicurezza biologica

### La legislazione

Il Titolo X del D.Lgs. 81/08 disciplina l'utilizzo degli agenti biologici nelle attività lavorative, incluse le attività di didattica e di ricerca prevedendo modalità di lavorazione e misure di sicurezza. Il Titolo comprende anche le attività che comportano l'uso non deliberato di detti agenti.

#### Definizioni

Si parla di uso deliberato quando gli agenti biologici vengono deliberatamente introdotti nel ciclo lavorativo per esservi trattati, manipolati o trasformati ovvero per sfruttarne le proprietà biologiche a qualsiasi titolo.

Si parla di esposizione potenziale quando si determina la presenza di agenti biologici, anche di gruppo 4, non orientata ad un vero e proprio uso, mancando il deliberato intento di farne oggetto dell'attività lavorativa.

*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.

Gruppo	Descrizione	Livello di contenimento
1	Presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani	Buona pratica di laboratorio microbiologico
2	Può causare malattia in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori, è poco probabile che si propaghi nella comunità, sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (es. morbillo, poliomielite, epatite A, candida)	Secondo
3	Può causare malattia grave in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può propagarsi nella comunità	di norma esistono efficaci misure profilattiche o terapeutiche (es. AIDS, epatite C, febbre gialla)
4	Può causare malattia grave in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può diffondersi facilmente nella comunità, non sono disponibili efficaci misure profilattiche e terapeutiche (es. ebola)	Quarto

L'esercizio da parte del datore di lavoro di attività comportante l'impiego di agenti biologici dei gruppi 2 e 3 implica la comunicazione all'organo di vigilanza locale, mentre l'uso di agenti biologici del gruppo 4 è sottoposto all'autorizzazione preventiva da parte del Ministero della Sanità.

Questo elenco di agenti biologici non prende in considerazione i microrganismi geneticamente modificati.

#### La valutazione del rischio

La valutazione del rischio deve necessariamente contenere informazioni accurate sugli agenti biologici utilizzati; la legge prevede l'obbligo per il datore di lavoro di adottare misure tecniche, organizzative, procedurali ed igieniche.

La stesura del documento di valutazione del rischio prevede un'attenta analisi della situazione lavorativa e si esplica attraverso la considerazione dei seguenti punti:

- Serie storica degli infortuni e/o esposizioni
- Agente biologico (trasmissibilità, morbosità e morbilità, resistenza)
- Identificazione del gruppo a rischio

- Stesura di piani di controllo (procedure di controllo, formazione ed informazione, DPI, visite mediche periodiche )
- Verifica periodica

La formazione e l'informazione devono riguardare in particolare:

- i rischi per la salute dovuti agli agenti utilizzati;
- le precauzioni da prendere per evitare l'esposizione;
- le misure igieniche da osservare;
- la funzione e il corretto utilizzo dei DPI e degli indumenti di lavoro;
- le procedure atte a prevenire il verificarsi di infortuni;
- le misure da adottare per ridurre al minimo le conseguenze in caso di infortunio.

La legge prevede misure specifiche rispettivamente per i servizi sanitari e veterinari, per i laboratori e stabulari e per i processi industriali.

#### *Gli operatori*

Tutti gli operatori (compresi gli studenti) devono osservare le norme operative di sicurezza e segnalare immediatamente qualsiasi malfunzionamento o situazione di pericolo di cui vengano a conoscenza. Devono inoltre utilizzare, mantenere efficienti e non rimuovere i dispositivi di protezione e di emergenza predisposti. Ove sia individuato un rischio di tipo biologico devono essere apposti sia il regolare segnale nero su fondo giallo (Allegato XLV, D. Lgs. 81/08) sia gli altri segnali di avvertimento appropriati.

E' buona prassi di laboratorio definire un protocollo operativo che regoli le operazioni più comuni con agenti biologici.

#### *Misure tecniche*

La norma impone le seguenti misure tecniche, organizzative e procedurali per eliminare o ridurre al minimo il rischio di esposizione:

- evitare l'utilizzo di agenti biologici nocivi se il tipo di attività lo consente;
- ridurre per quanto possibile il numero di addetti esposti al pericolo;
- adottare le misure per prevenire o ridurre al minimo la propagazione accidentale all'esterno dell'area di lavoro;
- adottare misure collettive di protezione ovvero misure di protezione individuale qualora non sia possibile evitare altrimenti l'esposizione;
- esporre in modo chiaro e visibile il segnale di rischio biologico;
- mettere in atto le procedure idonee per il prelievo, la manipolazione e il trattamento dei campioni di origine animale ed umana;
- definire le procedure di emergenza in caso di incidente;
- evitare l'utilizzo di contenitori non idonei e/o sprovvisti di indicazione del contenuto;
- adottare idonee misure igieniche.

### **Norme di comportamento nell'utilizzo di agenti biologici**

Il rischio biologico è un rischio professionale connesso alla possibilità di contrarre malattie da batteri, miceti, virus, parassiti presenti nel materiale da analizzare che si pone ogniqualvolta viene favorito il contatto tra agente biologico di malattia ed ospite.

#### *Le vie di penetrazione*

Sono di seguito riportate le comuni vie di penetrazione dell'agente biologico ed alcune misure da adottare al fine di minimizzare i rischi.

##### Bocca (ingestione)

- è vietato aspirare dalla pipetta con la bocca;
- è vietato mangiare e fumare in laboratorio;
- evitare di portare alla bocca le penne utilizzate all'interno del laboratorio.

##### Narici (inalazione)

- evitare di sorvegliare operazioni critiche come la semina ed l'apertura delle piastre e delle provette, la centrifugazione, l'omogeneizzazione senza indossare i DPI (dispositivi di protezione individuale).

##### Pelle (iniezione)

- maneggiare con molta attenzione aghi, pipette Pasteur, vetreria rotta;
- proteggere accuratamente tagli, ferite o abrasioni presenti sulla pelle.

##### Occhi (schizzi)

- proteggere sempre gli occhi

#### *Le precauzioni*

E' necessario trattare tutti i campioni biologici come potenzialmente pericolosi ed applicare le adeguate precauzioni:

- indossare i DPI (guanti, copricapo, visiera, occhiali, mascherina, sovracamice, calzari, grembiule impermeabile, etc.), controllarli, pulirli e disinfettarli al termine di ogni ciclo lavorativo. Gli indumenti di protezione vanno disinfettati prima del lavaggio. Lavarsi le mani dopo ogni procedura, sempre alla fine del lavoro e prima di lasciare il laboratorio. Inoltre le mani devono essere lavate immediatamente in caso di rottura dei guanti.
- tenere le mani lontano dal viso, soprattutto naso, bocca, occhi e lavarsele spesso; è implicito quindi il divieto di fumare, di conservare ed assumere cibi o bevande all'interno del laboratorio. Non applicarsi cosmetici e lenti a contatto.
- è vietato l'uso di pipette a bocca, utilizzare sistemi di tipo meccanico (pipettatrici automatiche) oppure pipette con filtro sulle teste.
- ridurre l'uso di aghi e di oggetti taglienti ed evitare assolutamente di rimettere i cappucci degli aghi dopo l'uso; eliminare in contenitori resistenti alla puntura posti in prossimità dell'area di lavoro.
- mantenere pulito ed in ordine il laboratorio e non introdurre sostanze ed oggetti estranei alle attività di lavoro. Alla fine del lavoro decontaminare i piani di lavoro con un disinfettante chimico di riconosciuta efficacia (vedi sotto); è consigliabile effettuare la rotazione periodica dei disinfettanti. Si consiglia di scegliere attrezzature facilmente decontaminabili.

Composto	Impiego ed avvertenze	Attività
Alcool etilico, etanolo 70%	Antisepsi della cute integra	mantenere sulle mani lavate per almeno 2 minuti, 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.
Amuchina 5%	Ampio spettro d'azione, antisepsi e di ferite superficiali, ustioni. Inattivato dalla presenza sostanze organiche. Soluzioni concentrate possono essere irritanti e tossiche.	Ampio spettro
Clorexidina al 4%	Può essere associata ad alcool etilico al 70% e cetrimide. Antisepsi di ferite, ustioni, lavaggio antisettico delle mani. Evitare il contatto con gli occhi e le orecchie. Alle concentrazioni normalmente impiegate non presenta effetti indesiderati.	Ampio spettro
Iodio e iodofori (paniodine, betadine)	Le soluzioni a base di iodio e gli iodofori sono potenzialmente irritanti per la cute. A basse concentrazioni in soluzione acquosa sono indicati per le piccole ferite, in base detergente per il lavaggio antisettico delle mani	Miceti(+++), Batteri Gram+ (+++), Batteri Gram- (+++), Mycobatteri (++) , Spore (+)
Glutaraldeide 2% attivata	Presenta attività disinfettante di 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.	Miceti(+++), Batteri Gram+ (+++), Batteri Gram- (+++), Mycobatteri (++) , Spore (+++, sopra i 20°C)
Derivati fenolici (es. ortofenilfenolo)	Disinfezione di pavimenti, superfici, arredi, oggetti. Stabile in presenza di materiale organico. Sono assorbiti da plastica, gomma, silicone da cui si rimuove con difficoltà. Irritanti della cute e delle mucose, usare guanti ed occhiali protettivi.	Miceti(+++), Batteri Gram+ (+++), Batteri Gram- (+++), Mycobatteri (++)
Cloramina T, ipoclorito di sodio (candeggina)	Disinfettanti di 1° scelta per oggetti, superfici contaminate, sporche di sangue o materiale organico, in questi casi, sono consigliate concentrazioni di 5000-10000 ppm. Danneggiano i metalli. Non usare in presenza di acidi. Prodotti tossici, usare guanti ed occhiali protettivi.	Miceti(+), Batteri Gram+ (+++), Batteri Gram- (+++), Mycobatteri (++)

### *Le manipolazioni*

Eeguire le manipolazioni di materiali potenzialmente infetti in modo da evitare qualsiasi dispersione del materiale stesso:

- aprire con cautela le fiale di materiale liofilizzato o congelato;
- lavorare in modo da minimizzare la formazione di aerosol; ad esempio, espellere il fluido in eccesso e le bolle da una siringa, verticalmente, in un tampone cotone inumidito con opportuno disinfettante;
- porre una vaschetta o un foglio di carta assorbente sopra il piano di lavoro;
- accertarsi, prima di centrifugare, che le provette non siano lesionate e che l'interno delle coppe portaprovette non presenti pareti ruvide;
- evitare di riempire le provette fino all'orlo;
- usare un tampone di ovatta inumidito con opportuno disinfettante attorno al tappo e all'ago quando si prelevano sostanze infette da un recipiente chiuso con tappo di gomma;
- tamponare, prima e dopo aver fatto un'iniezione ad un animale, la parte iniettata con disinfettante;
- ripulire periodicamente i contenitori riposti nel congelatore o nel ghiaccio secco, dove sono state conservate le colture, per rimuovere fiale o tubi rotti, indossando DPI per le mani e l'apparato respiratorio;
- evitare la diffusione di microrganismi sul banco di lavoro adottando anse monouso sterili in plastica;
- conservare i campioni biologici in contenitori a tenuta stagna, dopo la chiusura ermetica non devono rimanere all'esterno tracce del contenuto; etichettare in modo che sia sempre possibile riconoscerne il contenuto;
- in caso di versamento di materiale potenzialmente infetto coprire la superficie con un panno o carta assorbente imbevuto di disinfettante ed aspettare che eserciti la sua azione, quindi pulire usando le opportune precauzioni e riapplicare il sistema disinfettante. Informare sempre il responsabile del laboratorio dell'incidente;
- utilizzare appropriate cappe di sicurezza biologica per le manipolazioni di agenti biologici, sempre e per tutte le operazioni nel caso di agenti di gruppo 3 e 4;
- disinfettare gli apparecchi di laboratorio prima di qualsiasi intervento di manutenzione o riparazione.

### *Rischio connesso all'utilizzo di animali da esperimento*

Gli animali da esperimento, anche se non trattati/inoculati con agenti biologici, possono essere portatori asintomatici di malattie trasmissibili all'uomo (zoonosi); per questo motivo è necessario adottare le dovute precauzioni quando si lavora con animali da esperimento.

Gli animali devono essere acquistati da fornitori fidati che forniscano i dovuti certificati sanitari; devono essere correttamente trasportati, e successivamente stabulati in modo idoneo ed in ambienti puliti. E' indispensabile ricorrere a quarantena e a controlli clinici e di laboratorio in modo da evidenziare i soggetti malati o portatori di agenti patogeni trasmissibili. La cura, il trattamento e le applicazioni chirurgiche sugli animali devono essere affidate solo a personale preparato.

Gli operatori devono saper riconoscere sugli animali sia stati di malattia o di malessere (calo nell'assunzione del cibo e dell'acqua, perdita di peso, pelo arruffato, etc.) sia i segni di aggressività; è necessario ridurre i fattori di stress ambientale (sovraffollamento, parametri ambientali, etc.).

Gli animali vanno introdotti nel nuovo ambiente in maniera graduale in modo che si abituino gradatamente alla presenza dell'uomo e al nuovo ambiente (dove possibile non mescolare gruppi di animali).

Gli animali vanno manipolati, a seconda della specie, con tecniche idonee, con sicurezza e decisione. Si consiglia di utilizzare i mezzi di costrizione (collari, pinze, museruole) ed i DPI (guanti, occhiali, stivali).

La pulizia delle gabbie e la eliminazione della lettiera va effettuata evitando di sollevare polvere.

In caso di morsicatura o graffio pulire, disinfettare la ferita e sottoporsi sempre a controllo medico.

### La gestione dei rifiuti biologici

E' necessario disinfettare ed eliminare in modo corretto i rifiuti infetti, solidi e liquidi, e in modo che non possano presentare rischio per il personale addetto. Nessun tipo di rifiuto, se non di accertata innocuità chimica, infettivologica e ambientale può essere eliminato nei rifiuti normali.

Occorre:

- riporre i rifiuti in contenitori metallici a tenuta ermetica; essi andranno sterilizzati
- conservare adeguatamente pipette e siringhe dopo l'uso e sterilizzarle appena possibile
- per l'eliminazione dei rifiuti contaminati è necessario utilizzare gli appositi contenitori contraddistinti dal colore giallo

I rifiuti contaminati da materiale biologico prodotti dall'attività di laboratorio solitamente sono costituiti da:

#### *materiale non tagliente*

(es. guanti, mascherine, cuffie, garze, provette, contenitori e pipette usa e getta, piastre di Petri, tessuti umani o animali)

I rifiuti di questo genere vanno riposti negli appositi contenitori automontanti di cartone accoppiato bianco e giallo con la dicitura "*rifiuti sanitari pericolosi potenzialmente infetti*"

Ogni volta che questi contenitori vengono chiusi si deve versare:

- 100 cc di antisapril al 5% \* nei cartoni da 20 e 40 litri;

- 150 cc di antisapril al 5%\* nei cartoni da 60 litri.

\*(50 cc di antisapril in 950 cc di acqua)

#### *materiale tagliente*

(es. aghi, siringhe, vetreria intatta o rotta, vetrini per microscopio)

I rifiuti di questo genere vanno riposti negli appositi contenitori rigidi, di materiale plastico con dicitura "*rifiuti sanitari speciali pericolosi*"

Questi contenitori vanno smaltiti dentro i contenitori automontanti in cartone accoppiato.

Ogni volta che questi contenitori vengono chiusi si devono versare 50 cc di antisapril al 5% (50 cc di antisapril in 950 cc di acqua).

Ogni volta che un nuovo contenitore viene aperto si deve segnare la data con pennarello indelebile. Si ricorda che il deposito temporaneo presso il luogo di produzione di rifiuti sanitari pericolosi deve essere effettuato in condizioni tali da non causare alterazioni che comportino rischi per la salute e può avere una durata massima di 5 giorni.

**In caso di emergenza**

I lavoratori devono segnalare immediatamente qualsiasi infortunio o incidente che coinvolga l'utilizzo di agenti biologici.

I lavoratori devono conoscere perfettamente la procedura da adottare in caso di incidente che possa determinare la dispersione nell'ambiente di un agente biologico appartenente ai gruppi 2, 3 o 4.

Di seguito si riporta un esempio di procedura da seguire in caso di versamento fuori cappa di materiale biologico:

- trattenere il respiro
- chiudere porte e finestre
- lasciare la stanza chiudendo la porta
- chiamare la squadra di emergenza
- rimuovere i vestiti contaminati
- rimuovere i DPI e lavarsi la mani
- usare un disinfettante appropriato per almeno 20 minuti
- non lasciare l'area prima dell'arrivo della squadra di emergenza.

Se dovesse accadere un incidente, come una puntura d'ago oppure uno schizzo di sangue o altro materiale biologico su cute lesa o mucose, adottare le seguenti procedure.

Tipo d'incidente	Procedura
Puntura o taglio	1. Aumentare il sanguinamento della lesione 2. Detergere con acqua e sapone 3. Disinfettare la ferita con amuchina al 5-10% o prodotto a base di iodio (paniodine, betadine)
Contatto con mucosa orale	1. Lavare con acqua il viso e la bocca 2. Risciacquare la bocca con acqua e amuchina al 5% o acqua ossigenata
Contatto con la congiuntiva	1. Lavare il viso con acqua 2. Risciacquare la congiuntiva con abbondante acqua
Contatto cutaneo	1. Lavare la zona con acqua e sapone 2. Disinfettare la cute con amuchina al 5-10% o prodotto a base di iodio (paniodine, betadine)

### Le cappe di sicurezza biologica

Sono impianti che utilizzati correttamente eliminano o riducono il rischio per l'operatore e possono prevenire contaminazioni dei campione.

Le cappe di sicurezza biologica sono inefficaci per i rischi di natura chimica. Le cappe a flusso laminare, orizzontale o verticale, che proiettano aria all'esterno non proteggono l'operatore e non possono quindi essere utilizzate con agenti biologici.

#### *Definizioni*

*Flusso laminare:* flusso unidirezionale di filetti d'aria paralleli tra loro ed aventi tutti la stessa velocità (generalmente di 0,5 m/sec), che trascinano lontano dall'area di lavoro i contaminanti ed evitano la formazioni di vortici.

*Filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air):* prevengono la contaminazione particellare, trattengono almeno il 99,97% delle particelle di diametro 0,3 µm .

#### *Corretto uso delle cappe di sicurezza biologica*

- accertarsi che la cappa sia idonea al campione da trattare, alle operazioni da effettuare e sia perfettamente funzionante
- spegnere sempre la lampada a raggi UV se l'operatore è dentro la stanza
- posizionare il vetro frontale, se del tipo a scorrimento, all'altezza fissata per la maggior protezione dell'operatore
- lasciare in funzione la cappa almeno 10' prima di iniziare a lavorare per stabilizzare il flusso laminare e circa 10' dopo la fine dei lavori per "pulire" da una eventuale contaminazione aerodispersa.
- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro per non diminuire il passaggio di aria.
- eseguire tutte le operazioni nel mezzo o verso il fondo del piano di lavoro.
- non introdurre materiale sotto cappa dopo l'inizio dei lavori; evitare di muovere bruscamente gli avambracci evitare l'utilizzo dei becchi Bunsen. Le alterazioni del flusso laminare così provocate possono infatti provocare la fuoriuscita di agenti biologici, il calore può anche danneggiare il filtro HEPA.
- rimuovere immediatamente rovesciamenti o fuoriuscite di materiale biologico.
- estrarre dalla cappa il materiale potenzialmente infetto in contenitori chiusi a tenuta. puliti all'esterno ed etichettati con il segnale di rischio biologico; disinfettare le apparecchiature prima di rimuoverle dalla cappa.
- pulire e disinfettare la cappa ogni volta che si termina il lavoro togliendo eventualmente anche il piano forato. Utilizzare un disinfettante di provata efficacia nei confronti dei microrganismi eventualmente presenti.
- chiudere il vetro frontale, eventualmente accendere la lampada a raggi UV.

*Classificazione delle cappe di sicurezza biologica*

<b>Tipo</b>	<b>Caratteristiche</b>	<b>Impieghi</b>	<b>Protezione operatore</b>	<b>Protezione ambiente</b>	<b>Protezione campione</b>
Classe I	l'aria viene aspirata esclusivamente attraverso l'apertura frontale, prima di essere reimpressa nell'ambiente passa attraverso un filtro HEPA	basso rischio, microrganismi di gruppo 1 - 2	buona	ottima	scarsa
Classe II	flusso laminare verticale nell'area di lavoro, sistema di filtri HEPA a monte e a valle dei campione, solo una parte dell'aria entra dall'apertura frontale	medio rischio, microrganismi di gruppo 2 - 3	buona	ottima	ottima
Classe III (glove box)	sistema chiuso ermeticamente, in pressione negativa (filtro HEPA in entrata e doppio filtro HEPA in uscita), si accede tramite guanti	alto rischio, microrganismi di gruppo 4	ottima	ottima	buona

La classe II è ulteriormente suddivisa in tipi (A, B1 e B2) che si differenziano per il grado di protezione dei campione se oltre al campione biologico sono presenti sostanze mutagene, cancerogene, radioattive l'aria espulsa deve essere convogliata all'esterno, dopo idonea filtrazione.