



Rapporti ISTISAN

11/31



**Guida operativa per la manipolazione
di materiali a rischio biologico**



ISSN 1123-3117

**G. Morace, P. Fazzi, R. Ilari,
M. Salvatore, S. Caiola**

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Guida operativa per la manipolazione di materiali a rischio biologico

Graziella Morace (a), Paola Fazzi (b), Ramona Ilari (c),
Marco Salvatore (d), Stefania Caiola (e)

(a) Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

(c) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate

(d) Centro Nazionale Malattie Rare

(e) Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

11/31

Istituto Superiore di Sanità

Guida operativa per la manipolazione di materiali a rischio biologico.

Graziella Morace, Paola Fazzi, Ramona Ilari, Marco Salvatore, Stefania Caiola
2011, 32 p. Rapporti ISTISAN 11/31

Il laboratorio biologico è un ambiente di lavoro nel quale possono esistere pericoli per la salute e la sicurezza degli operatori. Purtroppo non sempre il personale addetto alle attività laboratoristiche percepisce il rischio al quale può essere esposto, spesso a causa di una scarsa informazione sulla reale portata del pericolo stesso, con la conseguente possibilità di danni per la salute, che a volte si manifestano a distanza di tempo. Conoscere le modalità operative per valutare e gestire il rischio di legato alla manipolazione di agenti infettivi consente di ridurre l'esposizione dei lavoratori e la possibile diffusione di microrganismi nell'ambiente. La presente guida è stata redatta allo scopo di divulgare informazioni sul corretto trattamento degli agenti biologici, sul loro smaltimento e alcuni principi fondamentali sulla gestione di eventuali emergenze tra coloro che lavorano nei laboratori biologici. In Appendice sono allegate norme e procedure specifiche per minimizzare i rischi nel laboratorio biologico.

Parole chiave: Agenti biologici; Rischio; Classificazione; Manipolazione; Smaltimento

Istituto Superiore di Sanità

Guidance on the correct handling of biological materials.

Graziella Morace, Paola Fazzi, Ramona Ilari, Marco Salvatore, Stefania Caiola
2011, 32 p. Rapporti ISTISAN 11/31 (in Italian)

Biological laboratories are working areas that can present health and safety risks for operators. Unfortunately, laboratory personnel is not always aware of those risks, often due to a insufficient information. As a consequence, health injuries can arise that, in some cases, can become evident after time. Knowledge of the correct assessment and management of the risks associated with handling infectious agents can reduce the exposure of workers and the possible spread of microorganisms to the environment. The current guidance has been prepared in order to disseminate information on the proper handling of biological agents and on their disposal and some fundamental principles regarding the management of potential laboratory emergencies among biological laboratory workers. Norms and procedures to be followed for reducing the risks in the biological laboratory are provided in the Annexes.

Keywords: Biological agents; Risk; Classification; Handling; Disposal

Si ringrazia il Responsabile del Servizio Prevenzione e Protezione dell'ISS, Sig. Eugenio Sorrentino, per il coordinamento.

Si ringraziano la dott.ssa Laura Nicolini (SBGSA, ISS) per la collaborazione fornita nella preparazione del presente documento e la dott.ssa Rosalba Masciulli (UGTSPL, ISS) per i suggerimenti.

Per informazioni su questo documento scrivere a: graziella.morace@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo testo come segue:

Morace G, Fazzi P, Ilari R, Salvatore M, Caiola S. *Guida operativa per la manipolazione di materiali a rischio biologico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/31)

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Scopo e destinatari della guida operativa	1
Definizioni e fonti normative	2
Definizioni	2
Fonti normative.....	2
Principali fattori di rischio presenti nei laboratori	3
Rischio biologico nei laboratori.....	3
Procedure comportamentali specifiche	5
Laboratori di livello di contenimento 1 (BSL1) e 2 (BSL2).....	5
Premessa.....	5
Procedure comportamentali.....	5
Laboratori di livello di contenimento 3 (BSL3).....	7
Premessa.....	7
Procedure comportamentali.....	7
Laboratori per lavorazioni con prioni	9
APPENDICE - Norme e procedure specifiche	11
Allegato 1 - Norme per i Laboratori di contenimento 1 e 2 (BSL1, BSL2).....	13
Allegato 2 - Norme per il Laboratorio di contenimento 3 (BSL 3).....	15
Allegato 3 - Procedure d'accesso e uscita dal Laboratorio BSL 3.....	17
Allegato 4 - Corretta utilizzazione degli strumenti	19
Allegato 5 - Autoclavi.....	22
Allegato 6 - Procedure di decontaminazione per laboratori dove si lavora con prioni	24
Allegato 7 - Procedure di emergenza in laboratorio	26
Allegato 8 - Modulo per denuncia di incidente/quasi incidente.....	29
Allegato 9 - Considerazioni sull'ipoclorito di sodio	31
Bibliografia di riferimento	32

SCOPO E DESTINATARI DELLA GUIDA OPERATIVA

Lo scopo di questa guida consiste nel definire le modalità operative per valutare e gestire i rischi connessi con la manipolazione di agenti biologici nei laboratori di ricerca, al di fine di ridurre il rischio di infezione o di dispersione nell'ambiente, tenendo presente quanto previsto dalle normative vigenti.

Il laboratorio nel quale vengono svolte attività di ricerca è, sotto ogni punto di vista, un ambiente di lavoro nel quale possono esistere pericoli per la salute e la sicurezza di coloro che vi operano.

Purtroppo non sempre il personale addetto alle attività laboratoristiche percepisce il rischio al quale può essere esposto, spesso a causa di una scarsa informazione sulla reale portata del pericolo stesso, con la conseguente possibilità di danni per la salute che possono manifestarsi anche a distanza di tempo.

Molte sono le norme emanate allo scopo di ridurre le fonti di rischio e la loro entità; le principali fanno parte dell'impianto legislativo del nostro Paese (DL.vo 81/08 e successive modifiche ed integrazioni) e prevedono sanzioni per i soggetti che risultino inadempienti ai rispettivi obblighi.

Per rendere effettiva la sicurezza sul luogo di lavoro, le norme prevedono che tutte le figure componenti la piramide organizzativa, a partire dal *Datore di Lavoro*, al *Dirigente*, al *Preposto*, per finire con il *Lavoratore* stesso, contribuiscano, ciascuno secondo le proprie competenze, alla realizzazione di un corretto sistema organizzativo e gestionale.

In ogni laboratorio deve essere individuato un Responsabile (Preposto) che ha anche il compito di informare, di formare ed addestrare il personale al corretto uso delle apparecchiature e delle sostanze presenti in reparto e di verificare l'adeguatezza delle attività svolte.

La presente guida si applica a quelle attività che prevedono l'impiego di agenti biologici classificati nel gruppo 2 o nel gruppo 3. Si segnala che la legge stabilisce che è vietato utilizzare agenti biologici classificati nel gruppo 4 senza aver ricevuto l'autorizzazione preventiva sia all'impiego che della struttura (laboratorio). In caso si intenda procedere con un progetto che prevede l'uso di questi agenti biologici è assolutamente necessario contattare in anticipo il Responsabile del Servizio di Prevenzione e Protezione.

In Appendice sono allegate norme e procedure specifiche da seguire per minimizzare i rischi nel laboratorio biologico.

DEFINIZIONI E FONTI NORMATIVE

Definizioni

- *Sicurezza*
indica una condizione oggettiva che non presenta pericoli o una situazione in cui sia garantito alle singole persone il tranquillo svolgimento delle proprie attività: la sicurezza è quindi la garanzia e la difesa contro eventuali pericoli che possono accadere nel corso delle diverse attività lavorative svolte ed strettamente collegata con le modalità operative messe in atto e con i mezzi di protezione disponibili. Sicurezza significa soprattutto salvaguardare l'integrità psico-fisica di chi lavora: la salute è infatti un diritto di tutti e la sua tutela presuppone che tutti si impegnino nei loro comportamenti rispettando le norme ed i doveri che la rendono attuabile.
- *Datore di lavoro*
il soggetto titolare del rapporto di lavoro con il lavoratore o, comunque, il soggetto che, ha la responsabilità dell'organizzazione stessa o dell'unità produttiva in quanto esercita i poteri decisionali e di spesa. Nelle pubbliche amministrazioni di cui all'articolo 1, comma 2, del Decreto legislativo 30 marzo 2001, n. 165, per datore di lavoro si intende il dirigente al quale spettano i poteri di gestione.
- *Dirigente*
persona che, in ragione delle competenze professionali e di poteri gerarchici e funzionali adeguati alla natura dell'incarico conferitogli, attua le direttive del datore di lavoro organizzando l'attività lavorativa e vigilando su di essa.
- *Preposto*
persona che, in ragione delle competenze professionali e nei limiti di poteri gerarchici e funzionali adeguati alla natura dell'incarico conferitogli, sovrintende alla attività lavorativa e garantisce l'attuazione delle direttive ricevute, controllandone la corretta esecuzione da parte dei lavoratori ed esercitando un funzionale potere di iniziativa.
- *Lavoratore*
persona che, indipendentemente dalla tipologia contrattuale, svolge un'attività lavorativa nell'ambito del luogo di lavoro, con o senza retribuzione, anche al solo fine di apprendimento.

Fonti normative

- *Decreto legislativo 81/2008, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro (e successive modifiche e integrazioni):*
Titolo X esposizione ad agenti biologici
Capo I: Disposizioni generali: Articoli da 266 a 270
Capo II: Obblighi del datore di lavoro: Articoli da 271 a 278
Capo III: Sorveglianza sanitaria: Articoli da 279 a 281
Capo IV: Sanzioni: Articoli da 282 a 286
Allegati: da 44 a 48
- *Direttiva Comunitaria 2000/54/CE del 18 settembre 2000 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.*
Decreto legislativo 201/2001 impiego in ambiente confinato di MOGM
Decreto legislativo 224/2003 rilascio deliberato nell'ambiente di OGM
Decreto legislativo 120/1992 sulle Buone Pratiche di Laboratorio

PRINCIPALI FATTORI DI RISCHIO PRESENTI NEI LABORATORI

I rischi in un laboratorio scientifico, sia chimico che biologico, sono legati alla presenza di una serie di fattori di pericolo sia di tipo materiale che procedurale quali ad esempio:

- agenti chimici, fisici, biologici;
- apparecchiature ad elevato voltaggio, centrifughe, sistemi a pressione e sottovuoto, alte e basse temperature;
- affollamento, limitazione dello spazio;
- aspetti di tipo organizzativo-gestionale:
 - difficoltà di comunicazione;
 - carenza di procedure;
 - molteplicità di tipologie di operatori o comunque di persone presenti nel laboratorio, quali personale strutturato (ricercatori, personale tecnico-scientifico), personale non strutturato (ricercatori a contratto, dottorandi, borsisti, assegnisti), ospiti a vario titolo;
 - carenza di informazione, formazione e addestramento del personale (soprattutto del personale non strutturato).

Di seguito viene riportata un'analisi dettagliata sul Rischio Biologico.

Rischio biologico nei laboratori

I soggetti che lavorano in laboratori dove si manipolano agenti biologici, o materiali di origine biologica, sono esposti al rischio di infezioni e, pertanto, hanno una maggiore possibilità di contrarre malattia.

Le più frequenti modalità di contaminazione in un laboratorio biologico sono rappresentate da:

- *inoculazione* di materiale infetto attraverso la cute;
- *ingestione* di materiale infetto per contaminazione delle mani;
- *formazione di aerosol* conseguente all'apertura di contenitori, di provette e capsule di Petri o all'impiego di agitatori, siringhe, centrifughe.

Gli *agenti biologici*, definiti dal DL.vo 81/2008 (titolo X) come “qualsiasi microrganismo anche geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie, intossicazioni” vengono classificati in quattro gruppi, per rischio crescente di infezione (allegato XLVI):

- *gruppo 1*, agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani (ovvero, sinteticamente: la sua manipolazione presenta nessuno o basso rischio individuale e collettivo);
- *gruppo 2*, agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghino nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ovvero: la sua manipolazione presenta moderato rischio individuale, limitato rischio collettivo);
- *gruppo 3*, agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ovvero: la sua manipolazione presenta elevato rischio individuale, basso rischio collettivo);

- *gruppo 4*, agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ovvero: la sua manipolazione presenta elevato rischio individuale e collettivo).

Oltre che con gli agenti biologici sopraindicati, in un laboratorio biologico è possibile trovarsi a lavorare anche con i *prioni* (o “virus lenti”), che sono causa delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) e, in particolare, delle seguenti malattie:

- *Specie umana*
 - malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD), inclusa la nuova variante (vCJD)
 - sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)
 - insonnia familiare fatale (IFF)
 - kuru
- *Ovini e Caprini*
 - scrapie
- *Bovini*
 - encefalopatia spongiforme bovina (BSE)
- *Altre specie*
 - encefalopatie trasmissibili del cervo, dell'alce e del visone
 - encefalopatia spongiforme felina (FSE)
 - ecc.

I microrganismi delle diverse classi devono essere manipolati in laboratori con caratteristiche di sicurezza specifiche, chiamate livelli di contenimento. Essi sono definiti, in base alle loro caratteristiche progettuali come:

- Laboratorio di base – livello di **contenimento 1**, per microrganismi appartenenti al gruppo 1.
- Laboratorio di base – livello di **contenimento 2**, per microrganismi appartenenti al gruppo 2.
- Laboratorio di sicurezza – livello di **contenimento 3**, per microrganismi appartenenti al gruppo 3.
- Laboratorio di massima sicurezza – livello di **contenimento 4**, per microrganismi appartenenti al gruppo 4.

Prioni: la scelta del livello di contenimento per lavori con gli agenti delle EST dipende dalla natura dell'agente e dei campioni da studiare. In base al Decreto 9 aprile 2008, n.81 e successive modifiche, in particolare nell'allegato XLVI, gli agenti delle EST sono classificati nel gruppo di rischio **2** (Scrapie) e **nel gruppo di rischio 3**** (BSE e CJD).

Gli agenti biologici classificati nel gruppo 3** non sono trasmessi per via aerea e quindi possono comportare un rischio di infezione limitato. Per tale motivo la loro manipolazione può avvenire in livello di contenimento 2.

PROCEDURE COMPORTAMENTALI SPECIFICHE

Laboratori di livello di contenimento 1 (BSL1) e 2 (BSL2)

Premessa

Nel laboratorio con livello di **contenimento 1** si lavorano agenti biologici che presentano poche probabilità di causare malattie in soggetti umani.

Nel laboratorio di **contenimento 2** si lavorano agenti biologici classificati nel gruppo di rischio 2.

Nelle attività di laboratorio con manipolazione di materiale infetto assume un ruolo rilevante, nella prevenzione della eventuale contaminazione dell'operatore e dell'ambiente, il corretto utilizzo delle cappe di sicurezza biologica (*biohazard*), che vengono quindi considerate attrezzature di contenimento fisico primario.

In base agli standard internazionali le cappe di sicurezza biologica vengono suddivise in 3 classi, a seconda del livello di protezione garantito. Le cappe di classe 1 sono in grado di proteggere l'operatore e l'ambiente dall'infezione/disseminazione di agenti biologici di gruppo 1 e 2 ma non proteggono i campioni da un'eventuale contaminazione esterna.

Le cappe di classe 2 assicurano la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Entrambe le cappe possono essere utilizzate per la manipolazione degli agenti biologici di gruppo 1 e 2.

Sebbene alcune precauzioni di sicurezza possano sembrare superflue per gli organismi del gruppo di rischio 1, è bene comunque applicarle a scopo di addestramento per promuovere una buona tecnica microbiologica (BTM), che è essenziale per la sicurezza in laboratorio e che non può essere sostituita da attrezzature specializzate.

A tale riguardo nell'Allegato 1 e nell'Allegato 4 è riportato un compendio di regole pratiche, relativo ai laboratori di livello di contenimento 1 e 2.

Di seguito sono descritte alcune regole fondamentali.

Procedure comportamentali

1. Protezione Personale

Prima di ogni attività di analisi o di ricerca all'interno del laboratorio deve essere indossato il camice. Tale indumento non va indossato in aree diverse dal laboratorio, come uffici, biblioteche e mense. Il camice non deve essere riposto nello stesso armadio degli abiti normali.

Gli indumenti contaminati devono essere sterilizzati.

Quando necessario, per proteggere gli occhi e il viso da spruzzi e da oggetti contundenti devono essere usati DPI appropriati.

Indossare guanti quando vengono eseguite procedure che comportino il rischio di contatto diretto con sangue o materiali infetti. I guanti devono essere adeguati al lavoro che si svolge. Dopo l'uso vanno tolti in modo asettico e autoclavati (Allegato 5) con gli altri rifiuti di laboratorio. Successivamente si procede al lavaggio delle mani con acqua e detergente per le mani.

2. Trasporto di campioni all'interno del Laboratorio

Lo spostamento dei campioni all'interno del laboratorio deve avvenire in contenitori di materiale infrangibile, con tappo a tenuta, correttamente etichettati per facilitarne l'identificazione. Per evitare perdite e versamenti accidentali durante il trasporto, detti contenitori devono essere posti in speciali contenitori secondari che assicurino la posizione verticale del campione. I contenitori secondari devono essere costituiti da materiale autoclavabile e resistente a disinfettanti chimici, inoltre devono essere regolarmente decontaminati.

3. Trasporto di campioni al di fuori del laboratorio o loro spedizione

Si deve adottare un sistema a doppio contenitore a tenuta ermetica con assorbente che garantisca, in caso di malaugurato incidente, la non fuoriuscita del liquido. Il contenitore deve essere sterilizzabile.

Nessun residuo deve rimanere sulla parete esterna del contenitore.

Ogni contenitore deve essere identificato con etichetta autoadesiva indelebile.

Gli eventuali documenti di accompagnamento non devono essere arrotolati attorno al contenitore ma inseriti in un sacchetto a doppia tasca ermetica.

Per gli agenti del gruppo 2, 3, 4 si deve prevedere l'applicazione del simbolo di rischio biologico sia sul contenitore che sulla documentazione.

4. Apertura del contenitore del campione

L'apertura dell'imballaggio del campione deve avvenire nei laboratori. Nel caso di contenitori con l'etichetta di "segnale di rischio biologico", l'apertura deve essere effettuata esclusivamente all'interno di una cappa di sicurezza biologica.

Prima della introduzione nel frigorifero del laboratorio, la parte esterna della provetta deve essere disinfettata (Allegato 10).

5. Eliminazione di Materiale non pericoloso

Si definisce materiale non pericoloso tutto il materiale cartaceo prodotto in laboratorio, materiale plastico o scatole di contenitori di medicinali o di kit. I materiali non pericolosi possono essere scartati come normali rifiuti nell'apposito cestino. Il cestino deve essere svuotato giornalmente dal personale di laboratorio o dal personale addetto alla pulizia. Nel cestino NON deve essere scartato materiale a rischio biologico o chimico, tagliente e acuminato.

6. Eliminazione di Materiale a Rischio Biologico

Si definisce materiale a Rischio Biologico qualsiasi materiale biologico di provenienza umana o animale potenzialmente contenente microrganismi patogeni vivi. Tale materiale e tutti i prodotti monouso che vengono a contatto con esso (fiasche, pipette, puntali, guanti, carta assorbente, ecc.) vengono direttamente scartati in appositi sacchetti autoclavabili.

Il materiale da eliminare utilizzato nel laboratorio di livello 1 deve essere posto negli appositi sacchetti posti all'interno dei bidoni neri con coperchio giallo, forniti dalla ditta incaricata dello smaltimento; i sacchetti devono essere chiusi con l'apposita chiusura. I bidoni pieni, chiusi con il coperchio, vanno avviati al punto di raccolta appositamente individuato.

Tutti i prodotti solidi contaminati del laboratorio di livello 2 (colture batteriche, campioni biologici, materiale monouso, ecc.) devono essere raccolti negli appositi sacchetti

autoclavabili (*biohazard*) che vengono posti, a loro volta, in contenitori rigidi e avviati alla decontaminazione mediante sterilizzazione in autoclave. Ogni sacco deve riportare chiaramente l'indicatore chimico che attesti l'avvenuta sterilizzazione. Sull'apposito registro si deve annotare l'operazione eseguita.

Qualora fosse necessario trasportare i sacchi in altro sito per la sterilizzazione, essi devono essere trasferiti mediante l'uso di appositi contenitori a tenuta (ad esempio bidoni in acciaio con coperchio). I sacchi sono introdotti in un doppio sacco di plastica e sterilizzati. Alla fine del procedimento di sterilizzazione essi sono quindi trasferiti in un contenitore apposito con il quale sono portati al centro di raccolta per lo smaltimento.

I contenitori per la raccolta degli oggetti taglienti devono essere rigidi, a prova di puntura, e non vanno riempiti fino all'orlo. Quando sono pieni per i 3/4 vanno chiusi e messi nei contenitori per "rifiuti infetti" e autoclavati.

Piccole quantità di rifiuti liquidi vengono poste in contenitori autoclavabili inseriti in sacchetti da autoclave, e avviate alla sterilizzazione. Se i rifiuti liquidi biologici sono in quantità elevata devono essere trattati con ipoclorito di sodio (2-3% di Cl attivo) (Allegato 9) e successivamente avviati allo smaltimento come rifiuti chimici.

7. Emergenze

Le procedure da seguire in caso di emergenza sono allegate (Allegato 7) e devono essere affisse, in estratto, nel Laboratorio.

Qualsiasi incidente accada in laboratorio, ma anche l'incidente evitato, va dichiarato al Servizio Prevenzione, utilizzando il modulo apposito (un esempio è fornito nell'Allegato 8).

Laboratori di livello di contenimento 3 (BSL3)

Premessa

Un laboratorio di contenimento di livello 3 è progettato e dotato di attrezzature tali da renderlo adeguato al lavoro con microorganismi del gruppo 3, ovvero quelli che presentano elevati rischi per il personale di laboratorio, ma bassi rischi per la comunità. Non possono, in tale laboratorio, essere utilizzati microorganismi di classe superiore, come indicato dall'allegato XIV del DL.vo 81/2008. L'accesso al laboratorio è consentito solo al personale autorizzato.

Basandosi sul principio che la Buona Tecnica Microbiologica (BTM) è fondamentale per la sicurezza in laboratorio, oltre al compendio di norme riportate nella sezione relativa ai laboratori di base di livello di contenimento 1 e 2, per i laboratori di livello di contenimento 3 è essenziale attenersi alle norme specifiche riportate nell'Allegato 2, nell'Allegato 3 e nell'Allegato 4.

Per la protezione dell'operatore e dell'ambiente gli agenti biologici di gruppo 3 devono essere manipolati sotto cappe biologiche di classe IIB1 o IIB2 (Allegato 4).

Procedure comportamentali

1. Procedure Operative Standard

Le lavorazioni devono essere svolte secondo le procedure concordate con il responsabile del Laboratorio BSL 3. Tali procedure devono essere adeguate per ogni singolo agente

biologico/livello di rischio individuato e per ciascuna tecnica da utilizzare e conformi alle buone pratiche di laboratorio. Le lavorazioni devono comunque essere svolte rispettando le indicazioni fornite nelle norme generali.

Prima di iniziare le attività, l'operatore deve verificare che siano disponibili i materiali e i dispositivi di protezione individuali e collettivi necessari allo svolgimento delle lavorazioni.

2. Procedure per l'eliminazione del materiale

Gli operatori autorizzati sono responsabili della decontaminazione di tutto il materiale da eliminare. Per il corretto smaltimento è necessario attenersi scrupolosamente alle seguenti modalità:

- Tutte le operazioni sperimentali devono essere condotte all'interno di una cappa di contenimento;
- Nessuna operazione con materiale infettivo deve essere condotta su banchi aperti;
- Possono essere usate solo pompe protette da filtri adatti e con trappola intermedia;
- Tutti i prodotti solidi contaminati del **laboratorio di livello 3** (colture batteriche, campioni biologici, materiale monouso, ecc.) devono essere raccolti negli appositi sacchetti autoclavabili (*biohazard*) che vengono posti, a loro volta, in contenitori rigidi e avviati alla decontaminazione mediante sterilizzazione in autoclave. Ogni sacco deve riportare chiaramente l'indicatore chimico che attesti l'avvenuta sterilizzazione. Sull'apposito registro si deve annotare l'operazione eseguita.

Qualora fosse necessario trasportare i sacchi in altro sito per la sterilizzazione, essi devono essere trasferiti mediante l'uso di appositi contenitori a tenuta (ad esempio bidoni in acciaio con coperchio). I sacchi sono introdotti in un doppio sacco di plastica e sterilizzati. Alla fine del procedimento di sterilizzazione essi sono quindi trasferiti in un contenitore apposito, con il quale sono portati al centro di raccolta per lo smaltimento.

I contenitori per la raccolta degli oggetti taglienti devono essere rigidi, a prova di puntura, e non vanno riempiti fino all'orlo. Quando sono pieni per i 3/4 vanno chiusi e messi nei contenitori per "rifiuti infetti" e autoclavati.

Cellule infettate da virus, liquidi biologici e di coltura devono essere: a) se in piccole quantità, messi all'interno di contenitori in plastica (provette eppendorf, tubi falcon) successivamente posti in contenitori chiusi, a tenuta, e quindi sterilizzati in autoclave (Allegato 5); b) se in quantità elevate, inattivate con ipoclorito di sodio. Il materiale liquido va versato negli appositi contenitori di plastica preriempiti con una quantità d'ipoclorito di sodio (al 2-3% di Cl attivo), che corrisponda al 20% del volume finale (Allegato 9).

3. Procedure di decontaminazione degli strumenti e delle superfici

Le soluzioni disinfettanti impiegate devono essere in grado di inattivare specificamente gli agenti patogeni in studio (Allegato 10). Per i retrovirus può essere usato sia l'ipoclorito di sodio che l'alcool al 70%. Il metodo più semplice ed efficace per inattivare i microorganismi è l'autoclave, ma non sempre è possibile perché alcuni tipi di strumenti sono danneggiati dal calore; in tal caso vanno esaminate le procedure specifiche che utilizzano la fumigazione con formaldeide (kit Esoform 70) o con altri prodotti meno tossici (in valutazione). La fumigazione con formaldeide è un metodo estremamente pericoloso e deve essere eseguito con precauzione da personale addestrato, seguendo le istruzioni del kit.

La fumigazione può essere utilizzata anche per la disinfezione delle cappe biologiche, in caso di necessità (Allegato 4).

4. Procedure di decontaminazione delle centrifughe

Gli adattatori per i tubi, i secchielli e i rotori vengono considerati contaminati.

4.1 Per decontaminare secchielli e rotori è necessario riempirli con un disinfettante adeguato (Allegato 10) e lasciar agire per 20 minuti, quindi pulire l'esterno con il disinfettante.

In caso di rottura di provette o di fuoriuscita di liquidi biologici all'interno della centrifuga:

- disinfettare mediante l'uso di un disinfettante adeguato (Allegato 10);
- dopo la disinfezione, eseguire la pulizia utilizzando guanti protettivi grossi o, in alternativa, guanti doppi; è necessario indossare sovra camice e visiera antischizzi;
- eventuale vetreria rotta va asportata con molta attenzione e per mezzo di pinze (i pezzi di vetro vanno smaltiti nei contenitori rigidi per taglienti).

5. Emergenze

Le procedure da seguire in caso di emergenza sono presenti in Allegato 7 e devono essere affisse, in estratto, nel Laboratorio.

Qualsiasi incidente che si verifichi in laboratorio, ma anche l'incidente evitato ("quasi incidente"), va dichiarato al Servizio Prevenzione, utilizzando il modulo apposito (vedi esempio in Allegato 8).

Laboratori per lavorazioni con prioni

1. Accesso ai locali

Per quanto riguarda l'ingresso, lo svolgimento di attività e l'uscita dai laboratori BSL2 e BSL3 si rimanda ai capitoli specifici della presente guida operativa.

2. Lavorazioni con materiale contenente prioni

È fortemente raccomandato l'uso di attrezzature dedicate, non condivise con altri laboratori e l'uso esclusivo di strumenti monouso in plastica.

3. Formazione del personale

L'accesso ai locali nei quali si lavora con materiale biologico infetto da Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (EST) deve essere limitato esclusivamente al personale che abbia ricevuto un'adeguata formazione e informazione sull'utilizzo, manipolazione e smaltimento di materiali e oggetti contaminati da prioni.

All'interno del laboratorio deve essere previsto un registro dei lavoratori esposti all'agente patogeno.

4. Procedure per l'eliminazione del materiale infetto

Gli agenti delle EST presentano un'insolita resistenza agli usuali metodi chimici e fisici di decontaminazione, quali formalina o ossido di etilene, e l'infettività persiste dopo trattamento in autoclave standard (ad esempio 121° C per 15 minuti o 134° C per 3 minuti). Sono inoltre estremamente resistenti ad alte dosi di radiazioni ionizzanti e UV ed è stato dimostrato che qualche attività residua sopravvive per lunghi periodi nell'ambiente.

Per questi motivi, nei laboratori in cui si utilizzano campioni contaminati da EST o potenzialmente infetti da EST, si attuano procedure particolari di decontaminazione con mezzi diversi da quelli convenzionali (Allegato 6).

5. Emergenze

Le procedure da seguire in caso di emergenza sono presenti in Allegato 7 e devono essere affisse, in estratto, nel Laboratorio.

Qualsiasi incidente che si verifichi in laboratorio, ma anche l'incidente evitato ("quasi incidente"), va dichiarato al Servizio Prevenzione, utilizzando il modulo apposito (vedi esempio in Allegato 8).

APPENDICE
Norme e procedure specifiche

Allegato 1

NORME PER I LABORATORI DI CONTENIMENTO 1 E 2 (BSL1, BSL2)

1. Sulle porte dei laboratori di classe 2 deve essere esposto il simbolo internazionale di rischio biologico.
2. Nelle aree di lavoro del laboratorio devono essere ammesse soltanto persone alle quali sia stata assicurata l'informazione/formazione specifica riguardo ai potenziali rischi connessi con l'attività lavorativa. È necessario un aggiornamento periodico di tutti gli operatori del laboratorio.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Nelle aree di lavoro del laboratorio non deve essere permesso mangiare, bere, fumare, conservare cibo e applicare cosmetici. Inoltre è vietato usare recipienti del laboratorio per conservare bevande o alimenti.
5. È sconsigliato l'uso di tacchi alti e di scarpe aperte. I capelli lunghi devono essere tenuti raccolti. Togliersi bracciali, anelli, collane, sciarpe e ciondoli di vario tipo.
6. Le etichette non devono essere inumidite leccandole, non si devono portare oggetti alla bocca.
7. Tutte le procedure tecniche devono essere condotte in modo da minimizzare la formazione di aerosol e goccioline.
8. Non tenere nelle tasche del camice forbici, spatole di acciaio, provette di vetro o materiale tagliente.
9. Si sconsiglia l'uso di lenti a contatto poiché possono essere causa di accumulo di sostanze nocive e, in caso d'incidente, possono pregiudicare le operazioni di primo soccorso. Se devono essere necessariamente indossate, è indispensabile usare occhiali di sicurezza.
10. Non lavorare mai da soli in laboratorio.
11. Non reincappucciare gli aghi e non spostarsi con gli aghi scoperti in mano. L'uso di aghi ipodermici e di siringhe per prelevare il contenuto di bottiglie a diaframma va limitato al minimo. Si devono usare cannule al posto degli aghi ogni volta che sia possibile.
12. Evitare il più possibile l'affollamento nel laboratorio.
13. Le porte del laboratorio vanno tenute chiuse durante il lavoro.
14. Non abbandonare materiale non identificabile nelle aree di lavoro.
15. Non appoggiare recipienti, bottiglie o apparecchi in prossimità del bordo del banco da lavoro.
16. Non bloccare le uscite di emergenza, i pannelli elettrici e le attrezzature di soccorso.
17. È vietato lasciare senza controllo reazioni in corso e apparecchi in funzione.
18. Etichettare correttamente e apporre la data su tutti i contenitori in modo da poterne riconoscere in ogni momento il contenuto.
19. Non toccare le maniglie delle porte e altri oggetti del laboratorio con i guanti con i quali sono stati maneggiati sostanze chimiche e materiale biologico.
20. Il laboratorio deve essere tenuto pulito, in ordine e sgombro da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro.
21. Deve esistere un programma di disinfestazione per il controllo di roditori e artropodi.
22. Le superfici di lavoro e le apparecchiature scientifiche devono essere decontaminate dopo qualsiasi versamento di materiali potenzialmente pericolosi e alla fine di ogni giorno di lavoro.
23. Vicino a ogni posto di lavoro vanno posizionati idonei contenitori per la raccolta dei rifiuti speciali di tipo sanitario.
24. Utilizzare preferibilmente materiale monouso.

25. Tutte le micropipette devono essere dotate di eiettore del puntale. Quest'ultimo deve essere eliminato insieme agli altri rifiuti speciali di tipo sanitario.
26. Le micropipette devono essere sempre mantenute in posizione verticale e mai adagiate sul banco da lavoro.
27. In caso di versamento di liquidi infetti, d'incidenti e di esposizione a materiale infetto deve essere immediatamente avvisato il responsabile del laboratorio, il quale deve tenere una registrazione scritta degli incidenti e comunicare l'accaduto al Servizio Prevenzione (esempio in Allegato 8).
28. Le donne in età fertile vanno informate dei rischi per il feto derivanti dall'esposizione ad agenti microbiologici. L'eventuale stato di gravidanza va notificato immediatamente al responsabile del laboratorio. In ogni caso, è vietato alle donne incinte lavorare in laboratorio.
29. Il preposto deve vigilare sulla corretta applicazione delle misure di prevenzione e protezione da parte di tutti i frequentatori del laboratorio con particolare attenzione nei confronti di borsisti, tesisti, specializzandi, ecc.

Allegato 2

NORME PER IL LABORATORIO DI CONTENIMENTO 3 (BSL 3)

L'accesso al Laboratorio di contenimento 3 (BSL 3) è consentito solo alle persone autorizzate, L'operatore otterrà l'autorizzazione, dopo essere stato istruito ad una corretta condotta sperimentale dal Responsabile dell'unità Operativa (preposto) o operatore da lui autorizzato Per ottenere l'autorizzazione all'accesso è necessario seguire le seguenti fasi:

1. Lettura del manuale fornito.
2. Breve istruzione pratica basata sia sull'osservazione di procedure sperimentali condotte nel laboratorio da parte di un operatore specializzato, sia l'esecuzione diretta delle stesse sotto la supervisione di un operatore autorizzato.
3. Gli eventuali ospiti (visitatori occasionali) possono entrare solo accompagnati da uno dei responsabili e devono attenersi alle procedure generali e di vestizione richieste.
4. Gli ospiti devono essere informati del potenziale rischio che le operazioni eseguite nel laboratorio presentano e non possono entrare mentre sono in corso delle operazioni sperimentali.
5. L'accesso è vietato a persone che non abbiano compiuto i 18 anni
6. È istituito un registro di prenotazione e un registro di accesso (vedi procedure di accesso).
7. Le operazioni e la permanenza nel Laboratorio BSL 3 devono essere limitate al minimo indispensabile.
8. Non è consentito uscire, anche temporaneamente, dal Laboratorio BSL 3, indossando i dispositivi di protezione individuale utilizzati.
9. Per gli esperimenti si deve utilizzare il più possibile materiale monouso. È proibito l'uso di pipette di vetro e di vetreria, con esclusione di vetrini per microscopio (sono preferibili quelli di plastica a perdere), e di strumenti con punte acuminate (siringhe, forbici, bisturi, pipette Pasteur, ecc.).
10. Si deve produrre il minor quantitativo possibile di rifiuti.
11. L'introduzione nei locali di materiale non strettamente indispensabile deve essere evitata.
12. Salvo casi giustificati e autorizzati, il materiale utilizzato nel Laboratorio BSL 3 non deve essere utilizzato al di fuori di esso.
13. Il materiale che è indispensabile trasferire al di fuori del Laboratorio BSL 3 deve essere prima autoclavato o disinfettato.
14. Le porte laboratorio BSL 3 devono essere mantenute chiuse mentre sono in corso gli esperimenti.
15. Tutte le operazioni di manipolazione di colture e di altro materiale infetto devono essere effettuate sotto cappa *biohazard* (Allegato 4).
16. La centrifugazione deve essere effettuata con provette chiuse e, dove possibile, in rotori dotati di chiusura ermetica. Le procedure operative sono incluse (Allegato 4).
17. Devono essere ridotte al minimo indispensabile tutte le operazioni che comportino formazione di aerosol.
18. Le fiaschette o altri contenitori di colture infette devono essere posizionate nell'incubatore a CO₂ negli appositi vassoi al fine di contenere eventuali contaminazioni accidentali dovute a rovesciamento delle fiasche.
19. Il malfunzionamento di un apparecchio deve essere tempestivamente segnalato al responsabile del Laboratorio BSL 3 che attiverà l'intervento di manutenzione e/o riparazione presso la ditta incaricata.
20. È vietato lasciare provette o altro materiale di lavoro sui banconi o su altre superfici dopo la fine delle attività.

21. Il laboratorio è provvisto di telefono. In caso di emergenza, l'operatore deve chiamare uno dei numeri identificati dalla lista presente vicino all'apparecchio.
22. Le istruzioni per le emergenze e i recapiti telefonici sono allegati ed esposti in estratto nel laboratorio.
23. Non toccare telefoni e maniglie delle porte con i guanti da lavoro.
24. Gli ultimi operatori, prima di uscire dal laboratorio, devono controllare che tutte le strumentazioni e le luci siano spente e che incubatori e frigoriferi/freezer siano perfettamente chiusi e funzionanti.

Allegato 3

PROCEDURE D'ACCESSO E USCITA DAL LABORATORIO BSL 3

Procedure d'accesso

1. Prenotazione

- L'operatore che abbia necessità di accedere al Laboratorio BSL 3 compila il registro, specificando la data, la cappa, il tempo di utilizzo e l'agente infettante con il quale intende lavorare.
- Deve essere applicata la regola delle "due persone", in base alla quale nessuno nel laboratorio dovrebbe mai lavorare da solo.
- Il segnale di rischio biologico deve essere esposto sulla porta del laboratorio e deve identificare i microorganismi con cui si sta lavorando.
- Se vi è necessità di introdurre materiale biologico nel laboratorio, il contenitore deve essere passato attraverso il pass box, in modo da facilitare le procedure di ingresso dell'operatore.
- A meno che non sia presente una idonea suddivisione tra ingresso e uscita, l'entrata e l'uscita nell'area BSL3 si effettuano rigorosamente attraverso il medesimo passaggio definito "zona filtro".
- L'operatore passa nel locale vestizione.

2. Vestizione

- Il materiale di vestizione ha lo scopo di proteggere l'operatore da contaminazioni da parte di materiale infettivo. Prima di iniziare le lavorazioni l'operatore deve effettuare la verifica della dotazione tecnica e di protezione necessaria per le lavorazioni.
- La vestizione avviene nell'anticamera situata subito dopo la prima porta d'accesso, che verrà chiusa dopo l'ingresso
- Per l'ingresso al laboratorio BSL3 è necessario indossare:
 - Tuta in Tyvec completa di copricapo o in alternativa camice monouso e cuffia
 - Calzari
 - Sopramaniche
 - 2 paia di guanti
 - Maschera di tipo FFP3
 - Occhiali protettivi o visiera (a seconda delle lavorazioni e dell'agente infettivo).
- Gli operatori autorizzati devono accedere al laboratorio portando con sé gli occhiali da vista personali, se necessari. A seconda delle lavorazioni e dell'agente infettante utilizzato può essere necessario indossare un paio di occhiali protettivi o la visiera monouso.
- Si raccomanda la presenza nel locale di vestizione di un contenitore autoclavabile per lo scarto di camice o tuta, cuffia, maschera, occhiali o visiera, 2° paio di guanti. In mancanza di questo rivolgersi al responsabile.
- All'interno dei laboratori sono conservati dispositivi di protezione individuale per eventuali ricambi.

Procedure per l'uscita

- A conclusione delle operazioni di lavoro, l'operatore deve provvedere al riordino (e alla pulizia) della strumentazione utilizzata.
- Se sono stati utilizzati piani di lavoro esterni alla cappa *biohazard*, foderati con carta tipo benchcote, è obbligatorio rimuoverla scartandola in una busta da autoclave.
- A lavorazione completata l'operatore deve:

- Se è stato utilizzato del ghiaccio, trasferirlo nel contenitore per i liquidi infetti.
- Se è stata utilizzata vetreria che deve essere riutilizzata, inserirla in una busta da autoclave separata.
- Chiudere il contenitore per i liquidi infetti e inserirlo nella busta per autoclave
- Chiudere la busta con il materiale infetto.
- Indossando ancora due paia di guanti disinfettare le mani con alcool al 70% o con un disinfettante appropriato.
- Inserire la busta/e nell'autoclave.
- Disinfettare il piano di lavoro utilizzando carta imbevuta con un disinfettante appropriato (Allegato 10) o irrorando le superfici con il disinfettante e asciugandole con carta pulita. I rifiuti di tale procedura devono essere eliminati nell'apposita busta da autoclave (chiuderla e metterla nell'autoclave).
- NB: se è stato usato ipoclorito di sodio, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi.
- Disinfettare nuovamente le mani.
- Chiudere la cappa.
- Eliminare le sopramaniche in una busta per autoclave.
- Disinfettare nuovamente i guanti.
- Eliminare il primo paio di guanti nella busta contenente le sopramaniche.
- Decontaminare le maniglie delle porte una volta al giorno con etanolo al 70% (o altro disinfettante, secondo necessità; Allegato 10) utilizzando carta (salviette), da autoclavare.
- Chiudere la busta.
- Inserire la busta nell'autoclave.
- Far partire l'autoclave secondo le procedure, esposte in prossimità dell'apparecchiatura.
- Attivato il ciclo di sterilizzazione, l'operatore passa nella zona vestizione chiudendo la porta d'accesso al BLS3.

Uscita dal locale di vestizione

L'operatore deve:

- Disinfettare i guanti.
- Togliere (ed eliminare) la visiera.
- Togliere (ed eliminare) la maschera.
- Togliere (ed eliminare) le soprascarpe.
- Togliere (ed eliminare) il camice o la tuta.
- Eliminare il secondo paio di guanti.
- Tutti i sistemi di protezione individuale devono essere eliminati in una busta da autoclave. La busta contenente questi indumenti deve essere chiusa; la sua sterilizzazione avverrà nell'autoclave all'interno del Laboratorio BSL 3 e sarà a carico dell'operatore immediatamente successivo.
- Chiudere la porta.

Uscita dall'area anti-BSL3

- Uscito dal locale di vestizione l'operatore deve compilare il registro di lavoro (o registro degli accessi).

Allegato 4

CORRETTA UTILIZZAZIONE DEGLI STRUMENTI

A. Cappe di sicurezza biologica

Nelle attività di laboratorio con manipolazione di materiale infetto assume un ruolo rilevante, nella prevenzione dell'eventuale contaminazione dell'operatore e dell'ambiente, il corretto utilizzo delle cappe di sicurezza biologica (*biohazard*). Le cappe biologiche sono considerate dispositivi di protezione collettiva e come tali da utilizzare in modo prioritario rispetto alle misure di protezione individuale.

In base agli standard internazionali, le cappe di sicurezza biologica sono suddivise in 3 classi a seconda del livello di protezione garantito, che dipende dalla barriera d'aria in aspirazione, dalla eventuale barriera anche fisica e dal sistema di filtrazione d'aria. La filtrazione dell'aria avviene tramite passaggio su filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air Filter*), capaci 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. Le cappe di classe I sono cappe ventilate aperte frontalmente; garantiscono la protezione dell'operatore mediante un flusso d'aria entrante ma non del prodotto in quanto l'aria in entrata non è filtrata. Possono essere utilizzate per la manipolazione di agenti biologici a basso rischio (classe 1 e 2) e allorché si compiono operazioni che non richiedono protezione del prodotto.

Le cappe di classe II sono cappe a flusso laminare verticale, aperte frontalmente, progettate per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Sia il flusso d'aria in entrata che quello in uscita passano attraverso un filtro HEPA. Vengono suddivise in sottoclassi in base alla percentuale d'aria riciclata/espulsa: la classe IIA può essere utilizzata per la manipolazione di agenti biologici di classe 1 e 2; le classi IIB1 e IIB2 possono essere utilizzate con agenti di classe 2 e 3. Le cappe di classe III sono cappe ventilate, totalmente chiuse 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. Sono utilizzate per lavorare con microrganismi ad alto rischio (classe 4) in quanto forniscono una barriera totale tra l'operatore e il prodotto.

Tutte le procedure sperimentali nelle quali siano presenti agenti infettivi devono essere condotte in cappe di sicurezza biologica. Alcune procedure, come operazioni di pipettamento, di trasferimento, di mescolamento, di centrifugazione, di sonicazione e di agitazione generano una rilevante quantità di aerosol ed è pertanto necessario eseguire tali operazioni mantenendo sempre al giusto livello il vetro di protezione della cappa stessa, al fine di proteggere nel miglior modo possibile l'operatore. A questo proposito è necessario ricordare che la cappa biologica fornisce un efficace contenimento solo quando vengono applicate corrette tecniche microbiologiche.

I seguenti suggerimenti sono utili nel contenimento di microrganismi:

1. mantenere la griglia anteriore libera; se il flusso d'aria attraverso la griglia viene bloccato non si otterrà la massima protezione dalla cappa;
2. quando si maneggiano agenti infettivi devono essere usati due paia di guanti, indossati fino sopra i polsini del camice. I guanti esterni vanno rimossi quando sono terminate le manipolazioni sotto la cappa;
3. i materiali che vengono riutilizzati senza essere autoclavati (contenitori, provette e piccoli strumenti) devono essere trattati con disinfettanti (Allegato 10);
4. non sono permessi fornelli Bunsen all'interno delle cappe; in caso fosse necessario sterilizzare anse per batteriologia, usare microbruciatori elettrici;
5. è essenziale una rigorosa pulizia della cappa prima e dopo l'uso; è inoltre buona regola lasciare la cappa priva di materiale da eliminare e pronta per il successivo operatore;
6. i contenitori per le pipette da eliminare o da autoclavare dovrebbero essere posizionati all'interno della cappa per non interrompere l'integrità del flusso d'aria, che potrebbe compromettere sia la protezione personale che quella del prodotto.
7. è necessaria una manutenzione periodica della cappa con sostituzione dei filtri e registrazione della funzionalità.
8. all'inizio e al termine delle procedure sperimentali:

- spegnere gli UV (se trovati accesi al momento di iniziare il lavoro);
- la cappa va messa in funzione mezz'ora prima dell'inizio del lavoro e spenta mezz'ora dopo l'attività;
- controllare che la cappa sia funzionante;
- pulire la cappa con un disinfettante (Allegato 10);
- assicurarsi che la griglia di aspirazione non sia bloccata da materiale o quaderni;
- tenere poco materiale sotto cappa e separare il materiale pulito dall'infecto;
- il materiale da autoclavare deve essere raccolto nel contenitore per rifiuti speciali;
- riporre il materiale da conservare appropriatamente;
- eliminare il paio di guanti esterno nel contenitore per rifiuti speciali ospedalieri.
- accendere gli UV alla fine del lavoro; lasciarli accesi per circa 30'.

Fumigazione delle cappe biologiche

- Per decontaminare le cappe biologiche, in caso di necessità, può essere utilizzata la fumigazione con formaldeide (kit Esoform 70) o con altri prodotti meno tossici (in valutazione).
- La fumigazione con formaldeide è una metodica è estremamente pericolosa e deve essere eseguita con precauzione da personale addestrato, seguendo le istruzioni del kit.
- Tutte le aperture della cappa devono essere sigillate con nastro adesivo prima di iniziare la fumigazione.
- La stanza dove è posta la cappa deve essere accuratamente aerata prima di entrarvi.
- Il personale che entra ad aprire le finestre deve indossare respiratori appropriati.

B. Centrifughe

B1. Centrifugazione a basso numero di giri

- Durante le operazioni di carico e scarico delle centrifughe indossare sempre i guanti.
- Tutte le centrifugazioni a bassa velocità vanno eseguite in provette chiuse con tappi (non con "parafilm"!), bilanciate accuratamente e poste negli appositi secchielli da centrifugazione muniti di coperchi o in rotori dotati di guarnizioni. L'uso di tali contenitori è necessario perché, qualora avvenga la rottura di una provetta, il materiale infecto rimarrà contenuto nel secchiello che potrà successivamente essere aperto e decontaminato sotto la cappa, evitando in tal modo la contaminazione di tutta la centrifuga. Per una corretta centrifugazione attenersi ai seguenti criteri:
 - prima di centrifugare ispezionare i tubi per la presenza di rotture o fessure;
 - verificare che nel secchiello sia inserito il tipo di adattatore idoneo alle provette in uso;
 - il processo di centrifugazione produce aerosol: riempire e decantare tutte le provette e le bottiglie sotto la cappa.
 - pulire l'esterno delle provette con il disinfettante prima di porle nel rotore;
 - non riempire mai le provette fino all'orlo perché si ha inevitabilmente perdita di liquido attraverso il tappo. Chiudere i tappi delle provette prima della centrifugazione;
 - per decontaminare un rotore o un secchiello, immergere il rotore in etanolo al 70%-80% (Allegato 10) o in una soluzione di ipoclorito di sodio al 2-3% di Cl attivo per 20 minuti, se non corrosivo per il materiale; immergere il rotore/secchiello in un detergente leggero e quindi risciacquare.

B2. Microcentrifughe

Le microcentrifughe che possiedono caratteristiche di contenimento, con doppio coperchio, possono essere impiegate al di fuori della cappa di sicurezza biologica, dopo essersi assicurati che la guarnizione sia presente nel coperchio del rotore e sia intatta. Gli altri modelli di microcentrifughe vanno utilizzati sotto cappe di sicurezza biologica.

B3. Ultracentrifughe

Gli operatori che intendono utilizzare l'ultracentrifuga devono controllare tutte le istruzioni operative, bilanciare esattamente le provette prima di inserirle nel rotore, inserire e togliere le provette dagli adattatori sotto cappa di sicurezza biologica.

C. Freezer

- Tubi, vials e provette vanno conservati in scatole da freezer o in porta provette chiaramente etichettati; il materiale privo di etichetta dovrebbe essere eliminato previa sterilizzazione.
- È importantissimo assicurarsi che le porte dei freezer siano chiuse ermeticamente. Gli operatori devono segnalare tempestivamente qualsiasi malfunzionamento dei freezer al Preposto.
- È buona norma pulirli e scongelarli periodicamente, verificarne il buono stato del contenuto ed eliminare i contenitori rotti.
- Durante la pulizia indossare guanti di gomma pesante, sopra camice, visiera antischizzi e utilizzare pinze per asportare frammenti di vetro e plastica; dopo la pulizia procedere alla disinfezione delle superfici del congelatore.

D. Agitatori magnetici, rotanti, vibranti (vortex)

Prima di utilizzare l'apparecchio per mescolare/agitare un campione verificare che:

- la velocità di rotazione sia adatta a non provocare schizzi o rotture dei contenitori;
- il contenitore del campione sia integro e chiuso ermeticamente (non con il solo parafilm);
- in caso sia necessario, trattenere con le mani il contenitore o il coperchio assicurarsi di garantire una buona presa;
- aprire i contenitori sotto cappa attendendo qualche minuto prima di sollevare il coperchio per permettere agli aerosol di depositarsi.

E. Bagni termostatati

- installare il bagno termostatato lontano da qualsiasi derivazione elettrica sotto tensione (prese, cavi apparecchi);
- riempire il bagno termostatato con acqua distillata, meglio se con l'aggiunta di un antimuffa o di un antimicrobico;
- sostituire l'acqua almeno una volta alla settimana. Ogni volta che appare sporca o si contamina trattarla come rifiuto infetto, aggiungendo ipoclorito di sodio (2-3% di cloro attivo), e successivamente smaltirla come rifiuto chimico. Periodicamente procedere ad una pulizia approfondita e disinfezione del bagno indossando i guanti;
- evitare di immergere nell'acqua le mani nude.

F. Omogeneizzatori, sonicatori

L'utilizzo di questi apparecchi può dar luogo a formazioni di schizzi e aerosol causati dalla pressione prodotta all'interno dei contenitori. Per contenere questi rischi occorre:

- utilizzare apparecchi progettati per l'uso di laboratorio in cappa di sicurezza biologica;
- riempire e aprire il contenitore in cappa di sicurezza biologica; attendere circa 10' prima di aprire il contenitore per permettere agli aerosol di depositarsi;
- verificare sempre prima dell'uso le condizioni dei contenitori e delle chiusure, evitare l'uso di contenitori di vetro, e comunque accertarsi che non siano incrinati;
- evitare di riempire i contenitori oltre misura;
- indossare sempre i guanti, una protezione per il viso e il camice monouso;
- nel caso dei sonicatori, l'utilizzatore dovrà indossare anche dispositivi individuali per la protezione dell'udito (tappi, cuffie).

Allegato 5

AUTOCLAVI

Sterilizzazione mediante autoclave

Premessa

La completa eliminazione di tutti i microrganismi presenti in un dato materiale è chiamata sterilizzazione, e può essere ottenuta utilizzando calore, mezzi fisici (rimozione delle cellule), radiazioni o agenti chimici. Dato che la sterilizzazione prevede la distruzione di tutti i microrganismi presenti, incluse le spore batteriche, una volta che un prodotto è stato sterilizzato e correttamente sigillato, rimarrà sterile indefinitamente.

La norma prevede che la procedura di sterilizzazione debba essere effettuata garantendo la sicurezza dell'operatore; questo avviene con l'uso di guanti – preferibilmente antigraffio – di indumenti protettivi e dispositivi di protezione del volto dagli schizzi di sostanze contaminate (come, ad esempio, le mascherine oro-nasali, gli occhiali protettivi o gli schermi protettivi). È importante che il trasporto da un'area all'altra del materiale da sterilizzare avvenga in contenitori accuratamente chiusi, in modo da ridurre il contatto accidentale con l'operatore e con l'ambiente circostante. Al fine di evitare la diffusione di germi, nel lavandino, sul camice, ecc. è vietato sciacquare gli strumenti prima che essi siano stati sterilizzati.

La sterilizzazione in autoclave è una tecnica che sfrutta contemporaneamente l'azione della temperatura e del vapore saturo per eliminare i microrganismi mediante denaturazione delle loro proteine e di altre molecole biologiche. Il funzionamento dell'autoclave è simile a quello della pentola a pressione che permette di far bollire l'acqua in tempi più rapidi rispetto a quelli previsti in condizioni normali di pressione e temperatura, permettendo una veloce distruzione dei microrganismi.

Le autoclavi più utilizzate nei laboratori di ricerca sono:

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

Carica delle autoclavi

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

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

– *Pretrattamento*

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

- *Sterilizzazione*
Durante questa fase il materiale viene riscaldato dalla T ambiente alla T di sterilizzazione per mezzo del vapore che si condensa su tutte le superfici più fredde della T del vapore. Quando la T e la P impostate vengono raggiunte queste vengono mantenute per un certo periodo di tempo (15 min a 121° C, o almeno 3 min a 134° C). La pressione e la temperatura di sterilizzazione vengono specificate nei cicli indicati nei manuali di utilizzo in relazione alle caratteristiche dei materiali da sterilizzare ed delle macchine stesse.
- *Post trattamento*
Durante questa fase il vapore presente nella camera viene eliminato, si crea il vuoto e tramite il ripristino barico l'aria pulita dall'esterno rientra nella camera attraverso un sistema filtrante; a questo punto inizia il raffreddamento che permette, dopo un certo periodo di tempo, di riaprire l'autoclave.

Precauzioni

1. La responsabilità delle operazioni e della manutenzione ordinaria deve essere assegnata a personale addestrato.
2. Il programma della manutenzione preventiva deve includere l'ispezione periodica da parte di personale qualificato della camera, della guarnizione dello sportello, e di tutti gli strumenti di misura e controllo.
3. Il vapore deve essere saturo e privo di agenti chimici che potrebbero contaminare gli oggetti nel corso della sterilizzazione.
4. Tutti i materiali da autoclavare devono essere posti in contenitori che permettano la pronta rimozione dell'aria e una buona penetrazione del calore; la camera non deve essere troppo riempita, così che il vapore possa arrivare uniformemente al contenuto.
5. Usare lenti flussi di estrazione dei vapori quando si autoclavano liquidi, poiché questi a causa del surriscaldamento possono entrare in ebollizione tumultuosa al momento della rimozione.
6. Gli operatori devono indossare guanti appropriati e visiere di protezione quando aprono l'autoclave, anche quando la temperatura è scesa sotto gli 80° C.
7. In ogni monitoraggio routinario delle prestazioni dell'autoclave, mettere al centro di ciascun carico indicatori biologici o termocoppie. Un regolare monitoraggio con termocoppie e l'abituale registrazione dei dati servono alla definizione dei corretti cicli di funzionamento.
8. Il filtro di scarico della camera (se presente) deve essere rimosso e pulito quotidianamente.
9. Utilizzare solo l'apposita carta da imballaggio per autoclave per confezionare il materiale.
10. Cestelli, cesti, contenitori di vetro devono essere in grado di resistere alle condizioni di temperatura e umidità senza alterarsi in alcun modo.
11. È buona norma utilizzare le apposite strisce adesive che indicano l'avvenuta sterilizzazione dell'oggetto.
12. Le procedure e il manuale d'uso degli strumenti devono essere collocati nelle vicinanze dell'apparecchiatura e devono risultare di pronta e facile consultazione da parte dell'operatore.

Allegato 6

PROCEDURE DI DECONTAMINAZIONE PER LABORATORI DOVE SI LAVORA CON PRIONI

In questo allegato vengono date indicazioni generali per la decontaminazione della strumentazione e degli ambienti.

La precauzione principale per l'operatore è quella di evitare l'ingestione o l'inalazione di materiali contaminati e l'inoculo attraverso punture o esposizione della cute lesa.

Ogni laboratorio in cui si lavora con materiale biologico infetto da prioni o potenzialmente tale dovrà dotarsi di procedure particolareggiate adatte al tipo di lavoro, al tipo di agente eziologico, al numero di persone addette alla lavorazione e alla tipologia degli ambienti.

Il metodo più sicuro e meno ambiguo per eliminare il rischio di infettività residua di strumenti o altro materiale contaminato è quello di eliminarli e distruggerli con l'incenerimento.

Se questa precauzione non è applicabile, gli strumenti devono essere sottoposti a una delle procedure di decontaminazione riportate in seguito.

Quando possibile, gli strumenti e l'altro materiale soggetto al riutilizzo, devono essere mantenuti umidi per tutto il tempo intercorrente tra la contaminazione e le procedure di decontaminazione, poiché da studi effettuati si è riscontrato che anche un brevissimo contatto degli strumenti con tessuti contaminati li rende altamente infetti, specialmente se vengono essiccati o trattati con agenti disinfettanti capaci di fissare le proteine (es. formaldeide).

Le raccomandazioni seguenti sono basate sulla migliore evidenza disponibile allo stato attuale e sono elencate in ordine di severità decrescente di trattamento.

1. Incenerimento

- Effettuarlo per tutti gli strumenti e materiali monouso e per i rifiuti.
- È il metodo preferito per tutti gli strumenti utilizzati o esposti a tessuti a elevata infettività.

2. Metodi chimici / autoclave per strumenti resistenti al calore

I metodi proposti di seguito sono alternativi e sono elencati in ordine di severità decrescente di trattamento. La scelta dipende dalla natura del materiale da trattare.

- A. Immergere in NaOH 1 N o Ipoclorito di Sodio (2-3% di cloro attivo) per un tempo non inferiore a 1 ora. Rimuovere gli strumenti dalla soluzione, sciacquarli e autoclavarli a 134° C (senza vuoto) per un tempo non inferiore a 30'; pulire e sottoporre a un ciclo di normale sterilizzazione a 121° C. Tale metodica è da considerarsi di prima scelta nelle situazioni di elevata infettività.
- B. Immergere in NaOH 1 N e bollire per 10 min a pressione atmosferica; pulire, sciacquare con acqua e sottoporre alla normale sterilizzazione.
- C. Immergere in Ipoclorito di Sodio 20.000 ppm di cloro attivo (da preferire) o NaOH 1 N (in alternativa) a temperatura ambiente per 1 ora; pulire, sciacquare con acqua e sottoporre alla normale sterilizzazione.

Per la procedura di decontaminazione da prioni dovrebbe essere utilizzata un'autoclave capace di operare come segue:

- Utilizzare come agente sterilizzante il calore umido (vapore).
- Essere idonea a trattare strumenti immersi in soluzione di Idrossido di Sodio.
- Non effettuare fasi di vuoto iniziale, sia per non essiccare il materiale, sia per non scaricare agenti prionici per la sicurezza degli operatori e dell'ambiente.
- Mantenere omogenea la miscela aria + vapore che si forma in camera in conseguenza di (C).
- Non scaricare dalla camera detta miscela, né la condensa che si forma, fino al termine del processo, sempre per la sicurezza dell'operatore e dell'ambiente.

3. Metodi chimici per la decontaminazione di superfici

- Irrigare con NaOH 2N (preparato con 80 grammi per litro d'acqua) o con ipoclorito di Sodio a concentrazione di 20.000-30.000 ppm (2-3%) di cloro attivo.
- Lasciare in posa per 1 ora.
- Assorbire con carta assorbente e sciacquare con acqua. La carta va eliminata come rifiuto chimico solido.

4. Precauzioni riguardanti l'uso di prodotti chimici per la decontaminazione

Consultare sempre le schede tecniche delle sostanze pericolose.

L'ipoclorito non corrode il vetro o l'alluminio ed è un agente efficace; tuttavia è corrosivo per l'acciaio inossidabile e per le autoclavi e (a differenza del NaOH) non può essere utilizzato in autoclave come soluzione di bagno degli strumenti.

L'ipoclorito di Sodio è instabile nel tempo e pertanto deve essere conservato in contenitori rigidi e lontano dalle fonti di luce (Allegato 9). Andrà manipolato utilizzando guanti di gomma o altro materiale, certificati per il rischio chimico da caustici; dovrà essere utilizzata una visiera a protezione degli occhi e del volto contro gli schizzi; potrà essere utilizzata una mascherina a protezione delle vie aeree tipo FFP2 nel caso di operazioni condotte per tempo prolungato e in locali poco ventilati.

Teoricamente il NaOH non corrode l'acciaio inossidabile, ma, in pratica, alcune tipologie di acciaio inossidabile possono essere danneggiate (comprese alcune utilizzate per gli strumenti chirurgici). È quindi necessario testare un campione o consultare il costruttore prima di effettuare le procedure di decontaminazione di una grande quantità di strumenti

Il NaOH è caustico ma ad azione relativamente lenta a temperatura ambiente. Può essere rimosso dalla cute o dai vestiti con l'acqua. Il NaOH caldo è altamente caustico e non deve essere maneggiato fintantoché non si è raffreddato. Il rischio connesso al NaOH caldo spiega la necessità di limitare la bollitura a 10 minuti, che è il tempo più breve noto per essere efficace. Il NaOH sia alla concentrazione 1N che a quella 2N andrà manipolato utilizzando guanti in gomma o altro materiale, certificati per il rischio chimico da caustici; dovrà essere utilizzata una visiera a protezione degli occhi e del volto contro gli schizzi; dovranno essere indossati indumenti che non lascino scoperte parti delle braccia o delle gambe.

Allegato 7

PROCEDURE DI EMERGENZA IN LABORATORIO

All'atto della comunicazione di emergenza che preveda l'abbandono del locale laboratorio:

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

Spargimento di liquidi sul piano di lavoro della cabina di sicurezza biologica

1. Portare la ventilazione della cabina alla massima velocità.
2. Indossare guanti e mascherina protettiva e disinfettare le superfici (Allegato 10). Trasferire tutto il raccolto, unitamente a guanti e maschera, in sacchetto termoresistente. Sterilizzare in autoclave.
NB: se è stato usato ipoclorito di sodio come disinfettante, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi.

Spargimento di liquidi biologici sul pavimento

1. Chiudere la porta a chiave vietando l'accesso ad estranei.
2. Indossare guanti e mascherina protettiva.
3. Neutralizzare e assorbire il liquido con l'apposita polvere e lasciare agire per 30 minuti oppure coprire il liquido con carta assorbente sulla quale versare un disinfettante adeguato (Allegato 10) e lasciarlo agire per 30 minuti.
4. Raccogliere la polvere con l'apposita paletta monouso o la carta assorbente con delle pinze con manico lungo, inserire in un sacchetto da autoclave e avviare all'autoclave.
NB: se è stato usato ipoclorito di sodio, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi.
5. Porre guanti e mascherina in un sacchetto termoresistente e sterilizzare in autoclave.

Misure di emergenza a seguito di incidente nel trasporto campioni

1. Informare il responsabile del laboratorio.
2. Isolare temporaneamente l'imballo.
3. Se non si conosce il patogeno trasportato, occorre identificarlo.
4. Distruggere o autoclavare l'imballo e il contenuto.
5. Se l'agente biologico appartiene al gruppo 2 (o superiori) le persone esposte devono essere tenute sotto controllo medico.

Iniezioni, tagli e abrasioni accidentali

1. Il soccorritore deve innanzitutto indossare guanti monouso.
2. Rimuovere gli abiti, lavare le mani e le parti coinvolte.
3. Lavare accuratamente la ferita.
4. Applicare un idoneo antisettico.
5. Pulire con garza sterile.
6. Comprimere localmente se ci sono piccole emorragie.
7. Coprire con garza la ferita.
8. Se necessario rivolgersi alle cure di un medico.

NB: se è possibile, contattare immediatamente uno dei lavoratori incaricati delle misure di primo soccorso, che sono dotati anche di borsa di pronto soccorso. Si consiglia di avere sempre a portata di mano i recapiti telefonici di coloro che lavorano nei pressi del proprio laboratorio.

Incidenti nel laboratorio BSL 3

Deve essere presente nel laboratorio BSL3, oltre che per ogni piano dell'edificio, il kit contenente l'occorrente per le operazioni di pulizia in caso di versamenti accidentali:

- ▶ panni assorbenti (almeno 7);
- ▶ pinze;
- ▶ contenitori per taglienti (1);
- ▶ ipoclorito di sodio al 2-3% di Cl attivo
- ▶ guanti grossi da cucina;
- ▶ guanti (vinile/lattice);
- ▶ sovracamice impermeabilizzato;
- ▶ cuffie;
- ▶ occhiali di protezione;
- ▶ mascherina ad alta efficienza FFP3;
- ▶ istruzioni per la pulizia;
- ▶ cartello di divieto d'ingresso per decontaminazione

Per evitare di inalare aerosol, lasciare la stanza.

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

8. Gli addetti alle emergenze possono rientrare nella BSL3.
9. Raccogliere la carta assorbente impregnata di ipoclorito ed eliminarla come rifiuto chimico solido.
10. Fumigare con formalina al 10% la stanza (400 ml, 2 ore di evaporazione) e/o le cappe (80 ml, 30 minuti di evaporazione) e lasciare agire i vapori per almeno 8 ore a flusso spento, premendo il bottone rosso sul pannello elettrico. Terminata la fumigazione il sistema di ricircolazione dell'aria si rimetterà in moto automaticamente.
11. Usare l'area BSL3 dopo 12 ore di ricircolazione dell'aria.
12. Rimuovere il materiale assorbente, pulire 3 volte con panno imbevuto di ipoclorito di sodio procedendo dall'esterno verso il punto di contaminazione e se si tratta di pareti verticali procedere dall'alto al basso. Effettuare l'ultimo passaggio con panno asciutto. Eventuali frammenti vanno rimossi con pinze e riposti in contenitori per taglienti.
13. Proseguire con le procedure di pulizia.

Versamento di materiale all'interno di cappe di sicurezza biologica

1. Mantenere la cappa in funzione.
2. Spruzzare o pulire con della carta imbevuta di disinfettante (Allegato 10).
3. Coprire la superficie di lavoro con il disinfettante adeguato e lasciar agire almeno 20 minuti; rimuovere il disinfettante con una spugna o con carta assorbente. Togliere le griglie e pulirle con della carta imbevuta di disinfettante; procedere quindi alla pulizia del fondo della cappa.
4. Autoclavare tutto il materiale usato per la pulizia e le griglie, se sono in acciaio.
NB: se è stato usato ipoclorito di sodio, il materiale non va autoclavato, ma eliminato come rifiuto chimico solido, in modo da evitare vapori pericolosi.

Versamenti accidentali di materiale infetto da prioni

A. In caso di contaminazione di superfici

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

B. In caso di contaminazione di mani o parti del corpo

1. Allontanare immediatamente eventuali indumenti sia da lavoro che personali impregnati e lasciarli nella zona.
2. Lavare accuratamente la parte facendosi eventualmente aiutare da colleghi dotati di indumenti protettivi e procedere alla disinfezione con ipoclorito di sodio al 2-3% di Cl attivo.
3. Smaltire gli indumenti contaminati in appositi sacchetti impermeabili che dovranno essere sigillati prima dell'uscita dal locale e mandati all'incenerimento.
4. Nel caso di incidenti che coinvolgano l'operatore, segnalare immediatamente l'accaduto al Servizio Prevenzione e Sicurezza del Lavoro, attraverso un apposito "Modulo per la segnalazione di incidente con potenziale esposizione ad agenti biologici".
5. All'interno del laboratorio dovrebbe essere previsto un registro dei lavoratori esposti all'agente patogeno.

Allegato 8

MODULO PER DENUNCIA DI INCIDENTE/QUASI INCIDENTE

Si riporta a titolo di esempio il modulo in uso presso l’Istituto Superiore di Sanità.

Modulo per segnalazione di infortunio, incidente o quasi incidente
 compilare gli spazi evidenziati in arancione

inviare **sempre** via mail a eugenio.sorrentino@iss.it

tipologia evento (barrare) **incidente** **quasi incidente**

Luogo

edificio piano stanza

tipologia (laboratorio, studio, corridoio, spazio esterno)

Data

gg mm aa

Ora

Accertatore **Lavoratore ISS compilatore (infortunato, preposto, addetto alle emergenze ecc..)**

Nome Cognome matr

Numero di telefono per chiarimenti

A. Infortunio

Stampare firmare e spedire modulo all'Uff. RU III allegando certificato medico e modulo di "Denuncia INAIL" se prognosi superiore ai tre giorni.

Nome Cognome matr

Nome Cognome matr

Nome Cognome matr

C. Infrastrutture

Inviare mail ai direttori di reparti responsabili delle infrastrutture

Attrezzature di lavoro

Materiali

segue

continua

Descrizione dei fatti [Indicare se nell'incidente si sia verificato un potenziale contatto con materiale contenente sostanze pericolose (frasi di rischio), radioattivo, agenti biologici (nome e classe di rischio); indicare antefatti, dinamica, situazione dopo l'evento, cause concrete, misure di emergenza intraprese]



f

Firme

solo se c'è un infortunio

Direttore di Reparto/settore (dell'infortunato)

Direttore di dipartimento/centro /servizio (dell'infortunato)

Allegato 9

CONSIDERAZIONI SULL'IPOCLORITO DI SODIO

L'ipoclorito commerciale (candeggina) contiene il 5% di Cl attivo nominale. Purtroppo l'ipoclorito è instabile e la concentrazione di cloro tende a diminuire nel tempo, specialmente se la soluzione è esposta alla luce e al calore.

In genere, i prodotti formulati per l'uso domestico, insieme all'ipoclorito contengono sostanze stabilizzanti che ne favoriscono la conservazione. In ogni caso, le soluzioni di ipoclorito devono essere mantenute al riparo della luce diretta del sole e in un luogo fresco. In condizioni non idonee, la degradazione dell'ipoclorito in NaCl e ossigeno è molto rapida; dopo 20-30' la decomposizione ha inizio e tale evento può rendere vane le operazioni di disinfezione a causa della bassa concentrazione di principio attivo nelle soluzioni disinfettanti utilizzate. Poiché l'unico modo per conoscere esattamente la concentrazione di cloro attivo nell'ipoclorito è attraverso la titolazione analitica, che non è praticabile routinariamente, si consiglia di utilizzare per la disinfezione ipoclorito prelevato da confezioni aperte di recente e conservato ben chiuso e al fresco e di **non** preparare in anticipo la soluzione con concentrazione al 2-3% di Cl attivo.

Per l'uso nel trattamento di rifiuti biologici liquidi, prima di aggiungere i rifiuti versare nel contenitore apposito una quantità della soluzione di ipoclorito (preparata fresca) pari al 20% del volume del contenitore.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Italia. Decreto legislativo 106/2009. Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* 5 agosto 2009, n. 180.
- Italia. Decreto legislativo 81/2008. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* 30 aprile 2008, n. 101.
- Italia. Direttiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio. Protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 262/21 del 17 ottobre 2000.
- Luzzi L, Morace G, Pisani G, Sbrenni S, Bucossi G, Toscano F, Forcina G. Linee guida per la gestione dei materiali biologici: ricezione dei campioni. *Notiz Ist Sup San* 2005;18(3):3-7. Disponibile all'indirizzo: www.iss.it/binary/publ/publi/Notiziario%20marzo.1113480789.pdf; ultima consultazione 09/12/2011.
- Morace G, Toscano F, Luzzi L, Pisani G, Sbrenni S. ISPGMBGE01.001 - Rev. 1. *Spedizione di materiale biologico o altro materiale rilevante per la ricerca scientifica*. Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/prev/cont/ISPGMBGE01_001_Spedizione_materiali_biologici.pdf; ultima consultazione 13/12/2011.
- Musmeci L. *Manuale operativo per la gestione dei rifiuti in ISS*. Febbraio 2001 (2° Rev. settembre 2005). Disponibile all'indirizzo: <http://progetti.iss.it/binary/prev/cont/Mrif.pdf>; ultima consultazione 09/12/2011.
- Vonesch N, Tomao P, Di Renzi S, Vita S, Signorini S. La biosicurezza nei laboratori per gli esposti ad agenti biologici. *G Ital Med Lav Erg* 2006;28(4):444-56.
- World Health Organization (Ed.). *Laboratory biosafety manual, 3rd ed*. Geneva 2004. Disponibile all'indirizzo: www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf; ultima consultazione 09/12/2011.



Alcuni suggerimenti per la scelta del disinfettante

La disinfezione è un processo utilizzato per trattare gli oggetti inanimati allo scopo di eliminare i microrganismi contaminanti. Un disinfettante è un prodotto chimico destinato a tale scopo e, per definizione dell'ente normativo europeo (CEN), deve possedere la capacità battericida e fungicida, eliminando in generale almeno il 99,99% di tali microrganismi (riduzione di 4 logaritmi). Alcuni disinfettanti possono avere anche attività virucida, ovvero la capacità di inattivare i virus, determinando una riduzione nel numero di virioni infettivi non inferiore a 4 logaritmi. I disinfettanti vanno distinti dagli antisettici, il cui scopo è l'eliminazione dei microrganismi dalla pelle da tessuti viventi, e che spesso sono meno aggressivi.

Molti tipi di sostanze chimiche e di composti possono essere utilizzati come disinfettanti, ma non tutte sono ugualmente efficaci contro i diversi microrganismi. Infatti mentre i batteri sono più sensibili all'azione di molti tipi di disinfettanti, i virus senza involucro e le spore sono molto più resistenti.

E' necessario quindi scegliere il disinfettante in base al tipo di microrganismo che si desidera eliminare.

I disinfettanti vengono comunemente suddivisi in 3 “livelli” in base all'attività sui diversi microrganismi: 1) disinfettanti di basso livello, 2) disinfettanti di livello intermedio; 3) disinfettanti di alto livello.

I disinfettanti di basso livello determinano la distruzione dei batteri in fase vegetativa, dei virus con involucro (come il virus dell'epatite B, il virus dell'epatite C, l'HIV) e di alcuni miceti.

Sono disinfettanti di basso livello:

- L'alcol etilico e l'alcol isopropilico diluiti al 70%
- I composti dell'ammonio quaternario
- I fenoli in soluzione detergente
- Gli iodofori in soluzione detergente
- Il sodio ipoclorito al 2% di cloro attivo.

I disinfettanti di livello intermedio determinano la distruzione dei batteri in fase vegetativa, del *Mycobacterium tuberculosis* e di molti miceti e virus, ma non sono attivi contro la maggior parte dei picornavirus.

Sono disinfettanti di livello intermedio:

- L'alcol etilico e l'alcol isopropilico diluiti all' 80-90%
- I fenoli in soluzione detergente
- Gli iodofori in soluzione detergente
- Il sodio ipoclorito al 3% di cloro attivo.

I disinfettanti di alto livello determinano la distruzione di tutti i microrganismi, inclusi i virus senza involucro e molte, ma non tutte, le spore batteriche.

Sono disinfettanti di alto livello:

- L'aldeide glutarica al 2%
- L'acido peracetico allo 0,2%-0,5%
- Il perossido di idrogeno stabilizzato al 6%
- Il sodio ipoclorito al 3-5% di cloro attivo.



**“Guida operativa per la manipolazione degli agenti biologici”
Allegato 10**

Pag. 2 di 2

E' da tenere presente che, per l'efficace eliminazione di diversi tipi di spore batteriche, le concentrazioni delle sostanze chimiche sopra indicate non sono sufficienti, ma a volte è necessario utilizzare concentrazioni più elevate.

In generale in commercio si trovano anche prodotti costituiti dall'associazione di più sostanze chimiche. In tali casi l'attività del prodotto contro i diversi microrganismi è indicata in etichetta. Vale la pena ricordare che i prodotti definiti genericamente come disinfettante non hanno attività contro tutti i virus, ma solo contro quelli con involucro. Nel caso di prodotti con l'attività virucida (= attività contro tutti i virus, compresi quelli “nudi”) o con attività sporicida queste devono essere indicate chiaramente in etichetta.