

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO

Gestione del rischio biologico nei laboratori dei Dipartimenti Scientifici

Dott.ssa Annalisa Serio
Università degli Studi di Teramo

Febbraio 2015

CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO



DEFINIZIONE DI RISCHIO BIOLOGICO

- *Biohazard* = rischio biologico



- Un agente di origine biologica che ha la capacità di produrre effetti sanitari indesiderati sull'uomo, per es. microrganismi, tossine, allergeni derivati da questi organismi; allergeni e tossine derivati da piante e animali

VIE DI CONTAMINAZIONE

- Iniezione

- Ingestione

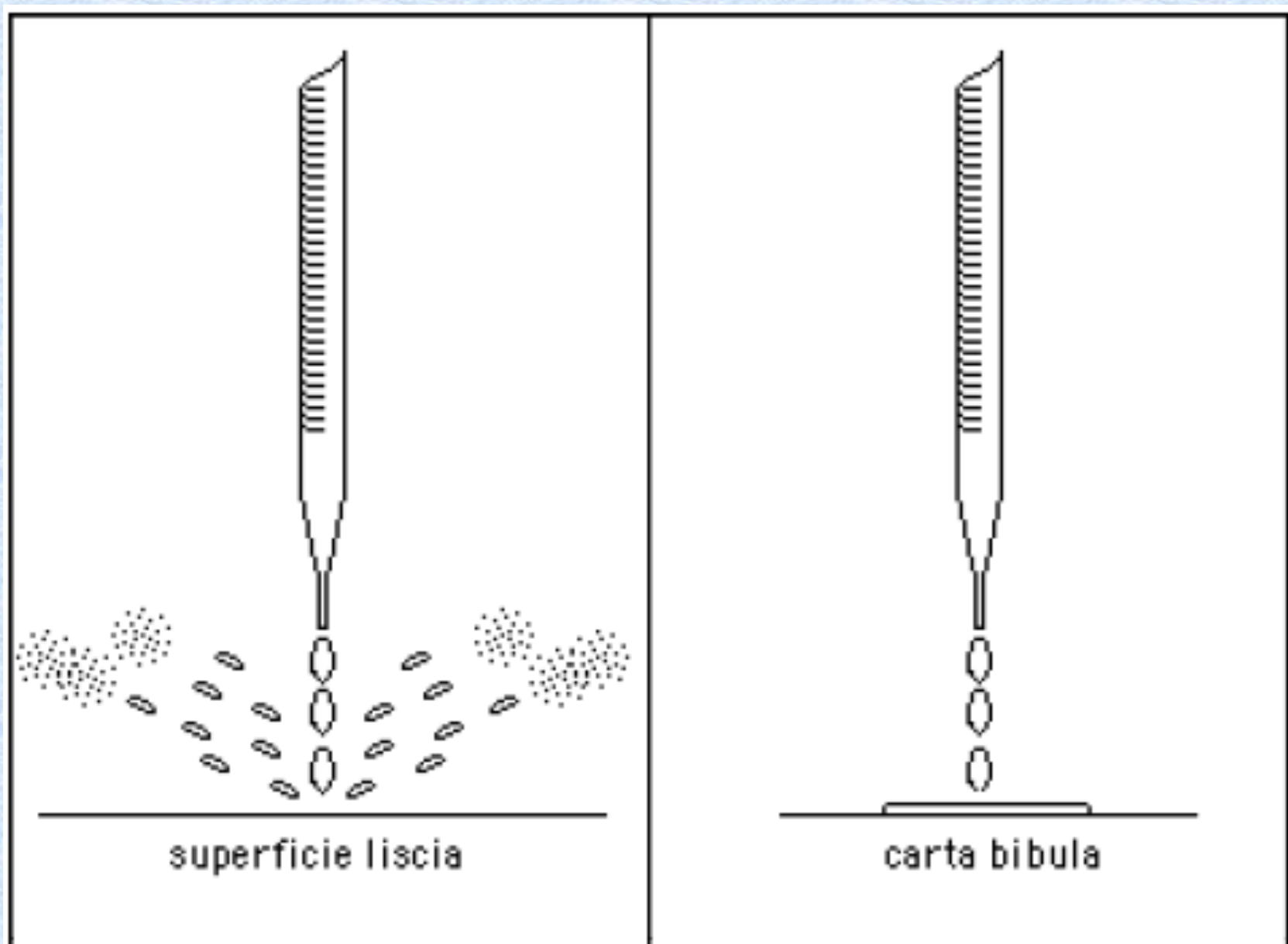


- Inalazione



AEROSOL: si generano quando materiali solidi vengono finemente sminuzzati o macinati o quando un fluido viene versato in un altro, o durante il mescolamento di sospensioni, ecc.

Le particelle più piccole (invisibili!) possono persistere nell'ambiente ed essere respirate, arrivando fino a polmoni e bronchi.



Rischi biologici nei laboratori della Facoltà di Bioscienze

salmonellosi, listeriosi, tossinfezioni alimentari, ecc.

- nelle operazioni diagnostiche
- nella manipolazione di campioni non sospetti e nel contatto con superfici/attrezzature
- per inalazione di aerosol

DEFINIZIONE DI BIOSICUREZZA (BIOSAFETY)

“Applicazione della combinazione di procedure e pratiche di laboratorio, di strutture di laboratorio e di attrezzature di sicurezza quando si lavori con rischi biologici (es. microrganismi potenzialmente infettanti)”

OBIETTIVI DELLE PROCEDURE DI BIOSICUREZZA

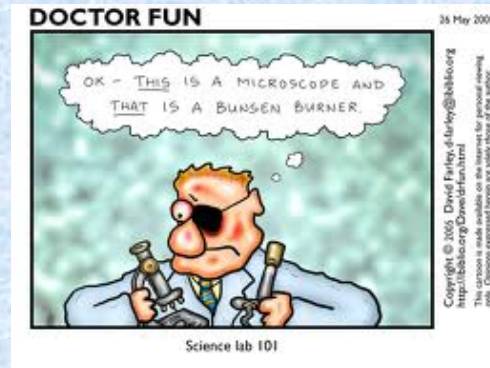
- Proteggere:
 - Operatori
 - Studenti
 - Personale di supporto
 - Ambiente
 - Campioni in fase di analisi

PRINCIPI GENERALI PER LA BIOSICUREZZA

- Supervisore ben informato
- Operatori ben informati e formati
- Consapevolezza dei rischi potenziali
- Competenza nella tecnica e nelle pratiche
- Attenzione alle procedure e manipolazioni
- Procedure di biosicurezza specifiche per il laboratorio
- Impiego di Dispositivi di Protezione Individuali

Regole generali

1. Comportamento informato e responsabile
2. Indossare il camice (ed eventualmente DPI)
3. Seguire le istruzioni prima di usare qualunque macchinario
4. Non mangiare o bere o fumare in laboratorio
5. Niente scherzi!
6. Mantenere le aree di lavoro pulite e ordinate
7. Lavare le mani prima di andare via
8. In caso di problemi o dubbi, chiedere!



Dispositivi di Protezione Individuale

(articolo 21 D. Leg. 81/2008)

- Guanti
- Calzature di sicurezza
- Occhiali di protezione
- Protezione del viso
- Protezione dell'udito
- Protezione delle vie respiratorie
- Elmetto di protezione
- Protezione per lavori in quota



ATTREZZATURA O
INDUMENTO CHE VA
INDOSSATO DAL
LAVORATORE PER
PROTEGGERLO DA
RISCHI CHE MINACCIANO
LA SUA SALUTE

DPI: protezione degli arti superiori



- Guanti di protezione contro i rischi meccanici (EN 388);
- Guanti di protezione contro i prodotti chimici e i microrganismi (EN 374/1/2/3);
- Guanti di protezione contro il calore o il fuoco (EN 407);
- Guanti di protezione contro il freddo (EN 511);
- Guanti elettricamente isolanti (UNI-EN 60903);
- Guanti e proteggi-braccia di maglia metallica (EN 1082-1);
- Guanti per ambienti sanitari.



Indicazioni per la scelta:

- tipo di materiale in funzione dell'inquinante;
- spessore;
- Tasso di permeazione.

DPI: protezione vie respiratorie

- facciale filtrante (materiale filtrante, può essere dotato di valvola di espirazione);
- semimaschera (copre solo naso e bocca);
- maschera (copre tutto il viso);
- elettrorespiratore (l'aria aspirata da un apparecchio autonomo viene filtrata e convogliata nella maschera).

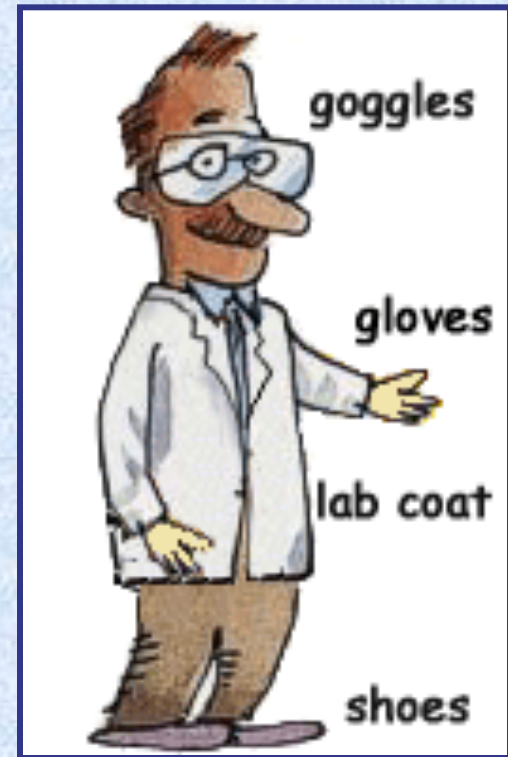
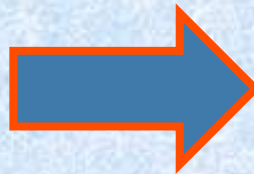


Respiratori a filtro:

- Antipolvere per polveri, fibre, fumi (particelle inferiori a 4 micron) e nebbie (goccioline liquide su base acquosa o organica);
- Antigas per gas e vapori (forma gassosa di sostanze liquide a temperatura ambiente);
- Combinati contro particelle, gas e vapori.



Dispositivi di protezione individuale



È entrata in vigore il 20 gennaio 2009 la nuova normativa europea CLP

(CLP = Classification, Labelling and Packaging) sulla classificazione, etichettatura ed imballaggio delle sostanze pericolose, che ha lo scopo di uniformare la legislazione europea con quella delle Nazioni Unite GHS (United Nations Globally Harmonised System). Questa normativa diventerà operativa per le **sostanze pure il 1° dicembre 2010** e per le **miscele il 1° giugno 2015** e sostituirà la direttiva per le sostanze pure la 67/548/EEC e quella per le miscele la 1999/45/EEC, dopo un periodo di transizione.

Segnaletica: i pittogrammi



ESPLOSIVO



INFIAMMABILE



COMBURENTE



GAS COMPRESSI



CORROSIVO



TOSSICO



**TOSSICO A
LUNGO TERMINE**



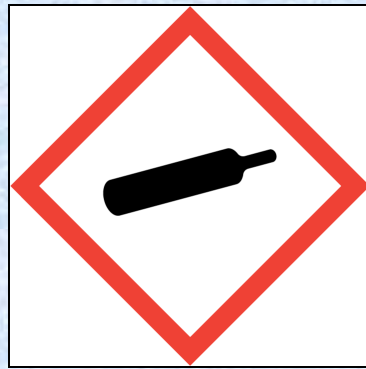
IRRITANTE



NOCIVO



**PERICOLOSO
PER L'AMBIENTE**



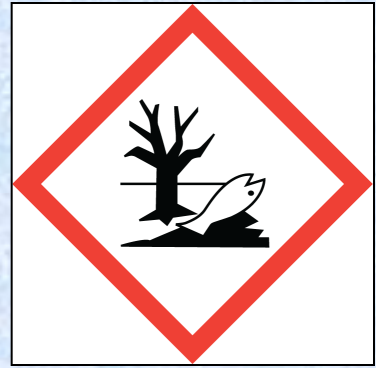
TOSSICITA'
ACUTA

CORROSIVI

INFIAMMABILI

GAS SOTTO
PRESSONE

ESPLOSIVI



COMBURENTI

PERICOLO PER
L'AMBIENTE

EFFETTI GRAVI
PER LA SALUTE

EFFETTI LIEVI
PER LA SALUTE

In vigore dal 2012

I simboli di pericolo



Attenzione/pericolo

Può irritare la pelle, scatenare allergie o eczemi, provocare sonnolenza. Può essere all'origine di intossicazioni dopo un unico contatto. Può danneggiare lo strato di ozono. Esempi: pastiglie per lavastoviglie, detersivi, candeggina.



Estremamente infiammabile

Può infiammarsi a contatto con fiamme, scintille, aria o acqua o se sottoposto a urti o surriscaldamento. In caso di stoccaggio non corretto può prendere fuoco anche senza agenti esterni. Esempi: accendigrill, bombole spray, solventi.



Comburente

Può provocare incendi o favorirne la propagazione. Siccome in presenza di fiamme libera ossigeno, il comburente può essere spento solo con speciali estintori. È impossibile soffocare la fiamma. Esempi: acqua ossigenata, candeggina.



Esplosivo

Può esplodere a contatto con fiamme, scintille, aria o acqua o se sottoposto a urti, sfregamento o surriscaldamento. In caso di stoccaggio non corretto può provocare esplosioni anche senza agenti esterni. Esempi: esplosivi, nitroglicerina.



Gas sotto pressione

Contiene gas compressi, liquefatti o disciolti. Gas inodori o invisibili possono fuoriuscire. Sotto l'azione del calore o di deformazioni, i contenitori di gas compressi possono esplodere. Esempi: bombole di propano e butano, bombole di CO₂ per gasatori d'acqua.



Pericoloso per l'ambiente acquatico

Può provocare danni acuti o progressivi a organismi acquatici come pesci, insetti acquatici e piante acquatiche, anche a basse concentrazioni. Esempi: antimuffa, spray insetticidi, prodotti chimici per piscine, oli per il motore.



Corrosivo

Può provocare gravi lesioni cutanee e danni oculari. Può sciogliere determinati materiali (p.es. tessuti). È nocivo per animali, piante e qualsiasi genere di materiale organico. Esempi: detersivi per il fono, decafcificanti, disgorganti per tubature, detersivi forti.



Pericoloso per la salute

Può danneggiare determinati organi. Può causare danni acuti o persistenti alla salute, provocare il cancro o alterazioni genetiche, nuocere alla fertilità. In caso di penetrazione nelle vie respiratorie può essere mortale. Esempi: benzina, vernici, oli per lampade, certi oli eterici.



Estremamente tossico

Può provocare gravi intossicazioni o addirittura la morte, anche in piccole quantità. Esempi: veleno per topi e ratti.

PRINCIPI

Requisiti generali del laboratorio

- *Safety equipment* (barriere primarie. Es. norme igieniche e tecniche)
- *Facility Design and Construction* (barriere secondarie. Es. protezione dell'ambiente extra-laboratorio, locazione, ventilazione, ecc.)
- Tecnica e pratica di laboratorio
 - Standard
 - Speciali

PRINCIPI

Dispositivi di protezione individuale ed attrezzature speciali

- *BioSafety Cabinets* (BSCs) – BSL 2/3
- Abbigliamento personale di protezione
 - Guanti
 - Camici
 - Protezione di volto e occhi
- Pipettatrici automatiche
- Centrifughe di sicurezza



Classificazione dei microrganismi sulla base della classe di rischio

Gruppo di rischio 1 (*nessun rischio, o basso rischio individuale e collettivo*)
Un microrganismo che difficilmente è causa di malattia nell'uomo o negli animali.

Rischio scarso

Gruppo di rischio 2 (*moderato rischio individuale, basso rischio collettivo*)
Un patogeno che può causare malattia nell'uomo o negli animali, ma che difficilmente pone un serio pericolo per il personale di laboratorio, la collettività, il bestiame o l'ambiente. L'esposizione in laboratorio può causare infezione grave, esistono misure preventive e terapie efficaci ed il rischio di diffusione dell'infezione è limitato.

Misure terapeutiche disponibili

Gruppo di rischio 3 (*elevato rischio individuale, basso rischio collettivo*)
Un patogeno che di solito è causa di grave malattia nell'uomo o negli animali ma che normalmente non si trasmette da un individuo infetto ad un altro. Esistono misure preventive e terapie efficaci.

Gruppo di rischio 4 (*elevato rischio individuale e collettivo*)
Un patogeno che usualmente provoca gravi malattie nell'uomo o negli animali e che può essere trasmesso da un individuo all'altro, per via diretta o indiretta. Non sono disponibili efficaci misure preventive o terapie.

BSL 1: Biosafety level 1

Adatto per un lavoro che coinvolge agenti ben caratterizzati non conosciuti come patogeni per soggetti (umani) adulti sani e di minimo potenziale rischio per il personale di laboratorio e per l'ambiente

- Esempi
 - *Citrobacter freundii*
 - Batteri lattici
 - *Pseudomonas* spp. (non *aeruginosa*)
 - *Staphylococcus* spp. (non *aureus*)

BSL 1

Standard Microbiological Practice

- Limitare l'accesso durante l'attività
- Vietato mangiare, bere, fumare
- Vietato pipettare con la bocca (utilizzare pipettatrici automatiche)
- Minimizzare schizzi e aerosol
- Decontaminare le superfici di lavoro quotidianamente
- Smaltire correttamente i rifiuti

BSL 2: Biosafety level 2

Adatto per un lavoro che coinvolge agenti **di moderato potenziale rischio** al personale di laboratorio ed all'ambiente: es. *Escherichia coli* (ceppi a patogenicità non specifica), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.
Immunizzazione o trattamento antibiotico disponibili

BSL 2 Facility Design

- Requisiti interni:
 - Porte con chiusura e accesso ristretto durante il lavoro
 - Lavandino per lavare le mani
 - BSC installate
 - Superfici di lavoro facilmente pulibili
 - *Top* dei banchi impermeabili

- Requisiti strutturali:

- Sede: separata da aree pubbliche

BSL 2 Facility Design

- Struttura: costruzione normale

- Ventilazione: direzionale

BSL 2 Safety equipment

- **Come BSL 1, più**

- BSCs (classe II) per lavoro con agenti infettivi con previsione di aerosol, schizzi, cariche microbiche elevate

- Autoclave

- Dispositivi per il lavaggio degli occhi facilmente accessibili.

BSL 2 Disposizioni speciali

- Supervisore laureato competente con responsabilità
- ✓ Limitare l'accesso agli immunocompromessi
- Personale di laboratorio consapevole e competente nelle pratiche e tecniche
- Precauzioni per aghi e taglienti
 - Utilizzare contenitori rigidi
 - NON rompere, piegare, reincappucciare o riutilizzare siringhe o aghi
 - NON smaltire aghi o taglienti in normali contenitori di rifiuti
 - NON toccare vetro rotto con le mani
 - Usare materiale di plastica



BSL 2 Disposizioni speciali

- Utilizzare contenitori rigidi e a tenuta di sversamenti
- Immunizzazione
- Decontaminare le superfici di lavoro
- Segnalazione di versamenti e incidenti
- NO ad animali in laboratorio

BSL 3: Biosafety level 3

Adatto per un lavoro con agenti che possono causare malattie potenzialmente epidemiche per le quali siano tuttavia disponibili misure profilattiche e/o terapeutiche (es. infezione grave, potenzialmente letale): es. *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* verocitotossico (VTEC)

Laboratory Facilities

- **Come BSL 1 e 2, più:**
 - Costruzione separata o zona isolata
 - Doppia porta d'ingresso
 - Flusso d'aria direzionale all'interno del laboratorio
 - Aria senza ricircolo (10-12 ricambi/ora)

BSL 3 Safety Equipment

■ **Come BSL 1 e 2, più:**

- Uso di BSCs (classe II o III) per manipolare materiale infettivo
- Eventuale protezione respiratoria

BSL 3 Disposizioni speciali

■ **Come BSL 2, più:**

- ✓ Lavoro in BSC certificato
- ✓ Uso di attrezzature di contenimento per bioaerosols
- ✓ Decontaminazione immediata in caso di versamento
- ✓ Restrizione di accesso.
- ✓ Addestramento particolare

Gruppo	Livello di Biosicurezza	Tipo di Laboratorio	Pratiche	Attrezzature
1	Base Livello 1	Insegnamento di base, ricerca	Buona pratica di laboratorio	Nessuna, banco da lavoro
2	Base Livello 2	Diagnostica di base, ricerca	Buona pratica di laboratorio più Dispositivi di protezione Individuali (DPI) e segnale di pericolo	Banco da lavoro più Cappe di sicurezza per le procedure che producono aerosol
3	Contenimento Livello 3	Diagnostica specialistica, ricerca	Come Livello 2 più DPI speciali, accesso controllato, ventilazione senza ricircolo	Cappe di sicurezza per tutte le procedure
4	Massimo contenimento Livello 4	Patogeni pericolosi	Come Livello 3 più ingresso autorizzato, doccia di decontaminazione, adeguato sistema di smaltimento dei materiali monouso come rifiuti	Cappe di sicurezza di classe III (glove-box) o Tute pressurizzate con Cappe di classe II, più autoclave passante e sistema di ventilazione con filtri assoluti

Cappe di sicurezza biologica

(Biological Safety Cabinet BSC)

SCOPO

- Protezione dei prodotti e dei campioni
- Protezione del personale
- Protezione dell'ambiente



Campioni potenzialmente infetti
Possibilità di aerosol
Rischio di contaminazione per via aerea

BSC:

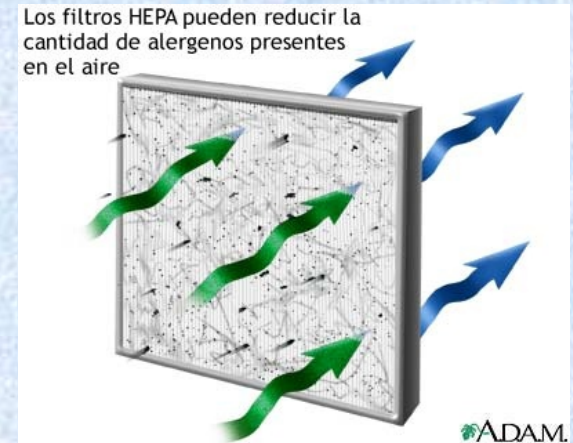
Tre classi a seconda del livello di protezione garantito che dipende da:

- barriera d'aria in aspirazione
- eventuale barriera anche fisica (Classe III)
- sistema di filtrazione dell'aria
- nel caso delle cappe di Classe I e II, dalla loro posizione nel locale in relazione alle correnti d'aria e ai movimenti del personale.

Filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air)

Tutte le cappe hanno un filtro HEPA sul flusso d'aria in espulsione;

Le cappe di Classe II e III sono dotate anche di un sistema di filtraggio HEPA dell'aria in ingresso sul piano di lavoro.



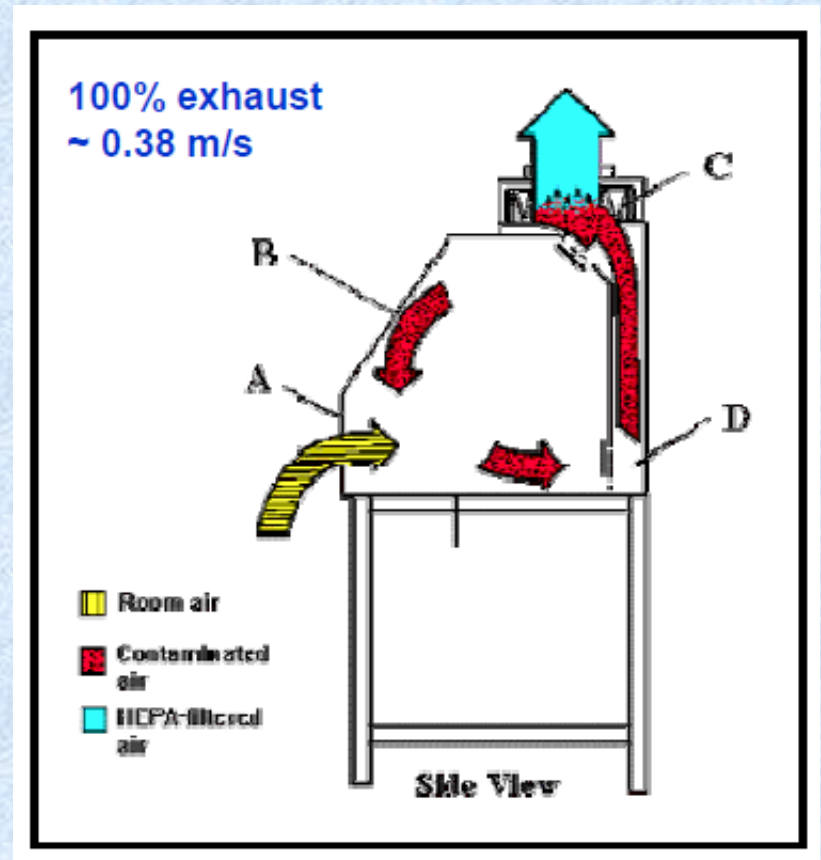
I filtri HEPA sono in grado di garantire al 99,97% il filtraggio di particelle di diametro uguale o maggiore a 0,3 micron. Detti filtri sono inefficaci nei confronti di gas o vapori.

CLASSE I

Protezione dell'operatore tramite un flusso d'aria aspirato verso l'interno da un'apertura frontale, senza prefiltra.

No protezione dei campioni da un'eventuale contaminazione esterna.

L'aria, una volta attraversata la superficie di lavoro, viene espulsa all'esterno dopo filtrazione HEPA.



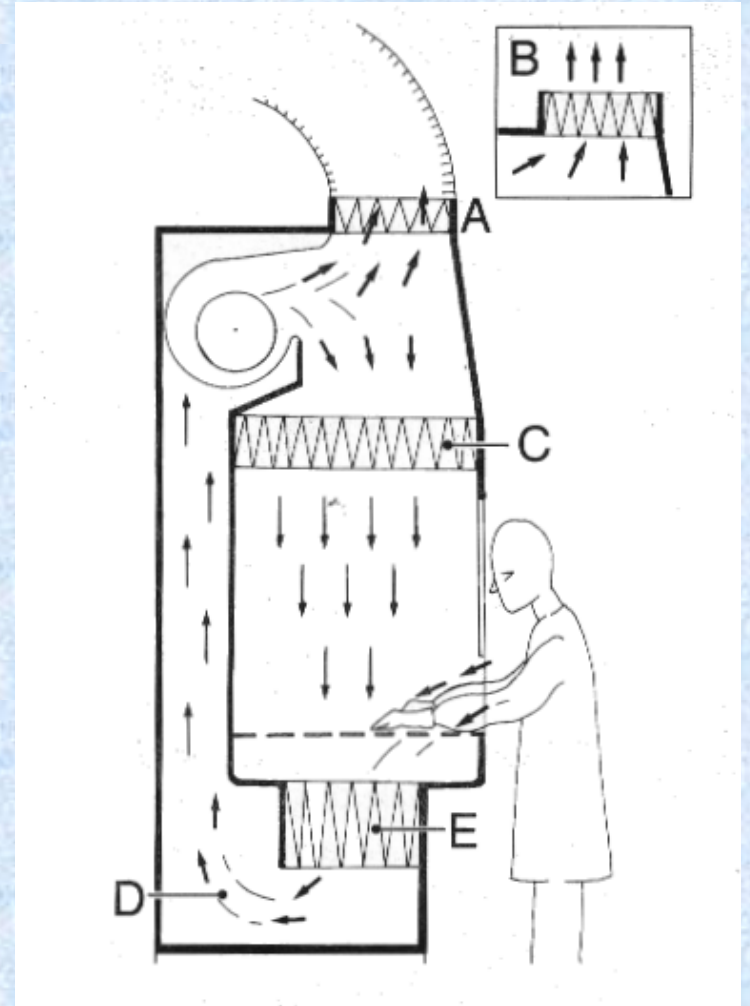
Da Karin Weyer

CLASSE II

Cappa ventilata aperta frontalmente:

protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante.

Flusso d'aria in ingresso e con filtrazione sia dell'aria aspirata sia di quella espulsa: il flusso laminare, proveniente dal sovrastante filtro HEPA, scende perpendicolarmente al piano di lavoro evitando di investire l'operatore



Classe III: "glove box" ermeticamente chiusi e a tenuta d'aria.

L'aria in ingresso viene immessa attraverso un filtro HEPA sul piano di lavoro, quindi espulsa attraverso un sistema a doppio filtro HEPA, assicurando all'ambiente interno una pressione negativa.



Corretto uso delle cappe

1. La cappa deve essere appropriata al campione da trattare, alle operazioni che devono essere eseguite, correttamente funzionante;
2. Prima dell'inizio dell'attività lavorativa, verificare che le lampade UV siano spente;
3. Accendere il motore di aspirazione almeno 10 minuti prima dell'inizio delle attività per stabilizzare il flusso laminare;
4. Assicurarsi che le griglie di aspirazione non siano bloccate da materiali, attrezzature, apparecchiature per garantire un corretto flusso laminare e ridurre allo stretto indispensabile la presenza sotto cappa di oggetti, contenitori, apparecchiature;

5. Sotto le cappe di Classe II e III è vietato l'uso di becchi Bunsen per evitare la deviazione del flusso interno dell'aria e il possibile danneggiamento dei filtri HEPA;
6. Lavorare il più possibile nella zona centrale della cappa;
7. I rifiuti delle lavorazioni devono essere posizionati in idonei contenitori per rifiuti biologici, collocati all'interno della cappa;
8. Le apparecchiature e i contenitori utilizzati devono essere disinfettati prima di essere rimossi dalla cappa;
9. Al termine delle attività, pulire accuratamente il piano di lavoro della cappa con materiale disinfettante;
10. Mantenere acceso il flusso per una decina di minuti, quindi spegnere.

In caso di versamento di materiale biologico all'interno della cappa, adottare la seguente procedura:

non spegnere la cappa;

rimuovere, immediatamente, dal piano di lavoro, con materiale imbevuto di disinfettante, i versamenti;

disinfettare le pareti, le superfici e gli strumenti (se il piano di lavoro è una superficie continua, coprirlo con disinfettante e lasciare agire per alcuni minuti; in caso contrario - ad esempio, piano forato - asportare i componenti e pulirli accuratamente con disinfettante);

lasciare la cappa in funzione per circa dieci minuti.

BSCs Sicurezza

- Adoperabile per sostanze chimiche tossiche non-volatili o materiale a bassa radioattività
- Adoperabile per minime quantità di sostanze chimiche volatili
- Certificazione annuale
- Sistemare tutto il materiale necessario al lavoro nel BSC prima di iniziare



BSCs Sicurezza

ATTENZIONE

- Sostanze chimiche possono danneggiare i filtri HEPA
- Rischio di esposizione a sostanze chimiche e agenti infettivi
- Sostanze chimiche volatili NON trattenute dai filtri HEPA
- Rischio di esposizione del personale in assenza di emissione all'esterno
- L'uso di sostanze chimiche può determinare fuoco/esplosione
- NON usare **MAI** sostanze altamente infiammabili

CENTRIFUGHE Tipologie

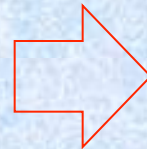
- Microcentrifughe
- A bassa o alta velocità
- Ultracentrifughe

velocità (rpm)

~ 15 000

2 000 – 20 000

~ 120 000



- **Disinfettare** settimanalmente e dopo ogni perdita o rottura
- Controllare il rotore prima dell'utilizzo
- Lubrificare periodicamente le parti mobili

CENTRIFUGHE Modalità d'uso

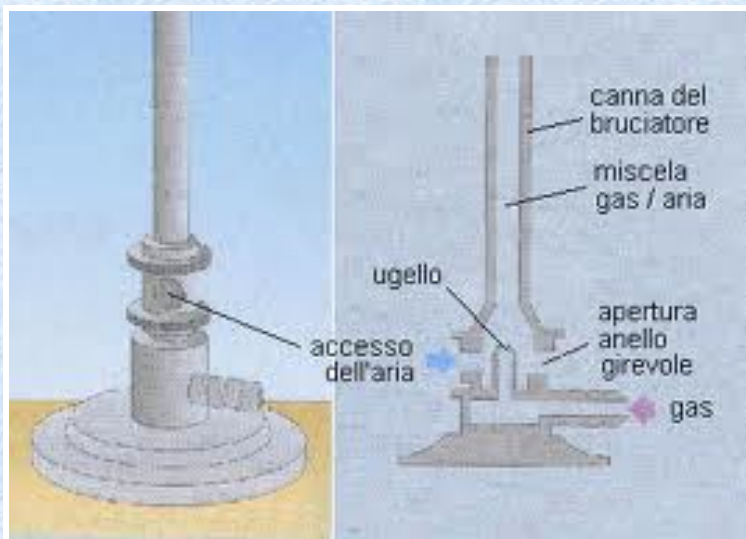
- Controllare le provette per rottura o scheggiatura
- Usare **set appaiati** di provette o contenitori
- Chiudere bene tutti le provette e le capsule di sicurezza
- Assicurarsi che il rotore sia correttamente posizionato
- **Chiudere il coperchio** durante l'uso
- Lasciar arrivare la centrifuga allo stop prima di aprire
- Disinfettare settimanalmente e dopo ogni perdita o rottura
 - Guasti meccanici
 - Rottura del materiale di laboratorio (provette ecc.)
 - Generazione di aerosol
 - Errore dell'operatore

RISCHI

Attrezzature pericolose

Becchi bunsen di sicurezza

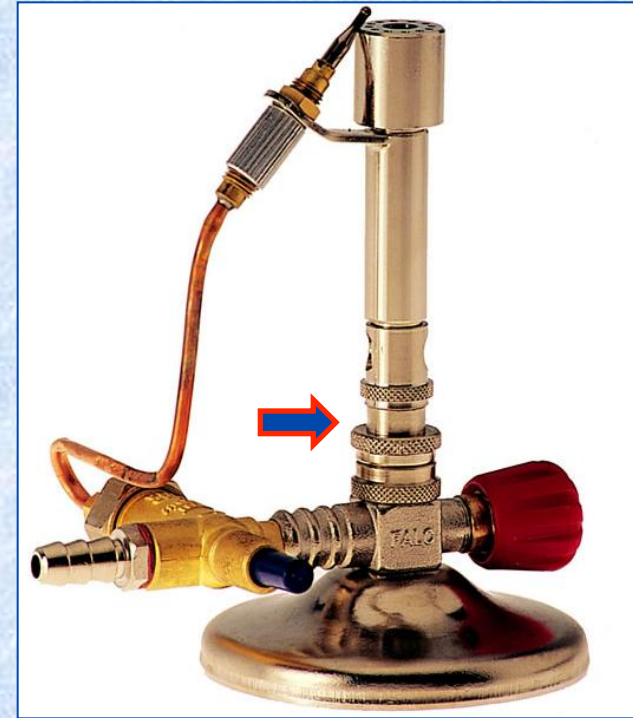
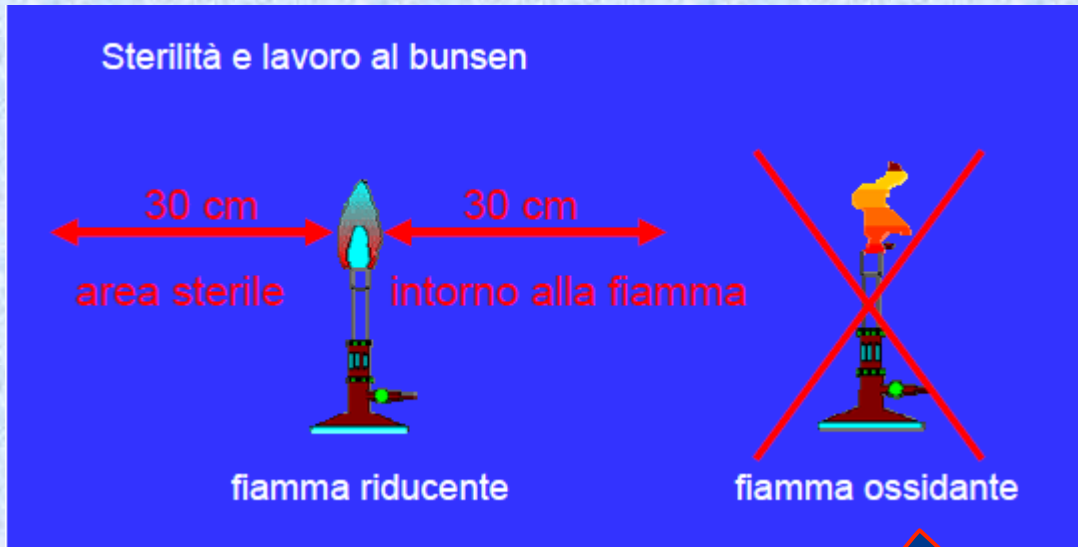
(tubo in gomma marcato UNI-CIG, utilizzati con aspirazione altrimenti in presenza di sistema di rivelazione gas)



Lascia la fiamma visibile quando ti allontani dal bunsen!

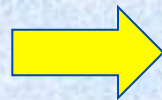


Becchi bunsen di sicurezza



Attrezzature pericolose

Autoclavi e in genere tutti gli apparecchi a pressione di gas o vapore ed i generatori di vapore sono soggetti alla recente normativa per le apparecchiature a pressione (tra i vari adempimenti è necessaria la dichiarazione CE di conformità per le apparecchiature nuove e il libretto d'immatricolazione per gli apparecchi esistenti)



CONTROLLA: Temperatura

Pressione

Valvole

Acqua

Sacchetti



Come autoclavare:

- Dividere materiale “pulito” da quello “sporco”
- Non compattare il materiale
- Non serrare i sistemi di chiusura dei contenitori (fiale, bottiglie)
- Verificare il corretto funzionamento dell'autoclave prima di abbandonare l'area
- Iniziare lo svuotamento a temperature inferiori ai 90°C ed in assenza di pressione
- Utilizzare gli appositi guanti termoresistenti
- Eseguire periodicamente i controlli di efficacia ed efficienza
- Utilizzare gli appositi sacchetti per la sterilizzazione del materiale infetto

In conclusione...

... per garantire la sicurezza dai pericoli biologici occorrono:

1. Informazione e conoscenza
2. Attenzione
3. Buon senso

**LA SICUREZZA DEL
LABORATORIO DIPENDE DA
OGNUNO DI NOI**