

Il rischio biologico nei laboratori

a cura di
Paola Muzi e Mauro Bologna

Introduzione

Lavorare con microrganismi, siano essi agenti patogeni o microrganismi geneticamente modificati, costituisce un potenziale rischio per scienziati, lavoratori del settore della salute pubblica, impiegati di aziende farmaceutiche ed anche per la popolazione generale, se i microrganismi stessi si liberano nell'ambiente. La scarsa accuratezza nel manipolare materiale infetto, le punture accidentali con aghi da prelievo o l'esposizione ad aerosol infetti sono la causa di numerose infezioni acquisite in laboratorio. La biosicurezza, corollario della biocontaminazione, è basata sulla combinazione di buone tecniche microbiologiche, una razionale organizzazione del laboratorio e adeguati equipaggiamenti di sicurezza.

Si stima che negli Stati Uniti siano circa 500.000 i lavoratori che operano nei laboratori e che si trovano a rischio di esposizione ad agenti infettanti

potenzialmente patogeni; le malattie infettive collegate vanno da infezioni completamente silenti ed innocue fino a patologie gravi che possono compromettere l'esistenza dell'individuo. Tuttavia il rischio al quale è esposto ogni singolo lavoratore non è facilmente quantificabile.

Il problema costante del diffusissimo virus dell'epatite B e il riemergere del quasi dimenticato micobatterio della tubercolosi hanno rinnovato l'interesse per la sicurezza del personale che opera nei laboratori. Ma soprattutto la comparsa della sindrome della immunodeficienza acquisita (AIDS) ed il suo dilagare, assieme alla descrizione dei primi casi di infezioni occupazionali da HIV negli operatori del settore della salute pubblica, hanno provocato una forte preoccupazione tra chi lavora nei laboratori. Infatti è stato dimostrato che il 21% dei casi documentati nel mondo di infezioni occupazionali da HIV si è manifestata tra personale di laboratorio.

Il punto di partenza per un accurato programma di biosicurezza è rappresentato dalla conoscenza del rischio per gli operatori del settore. Le principali linee guida per la valutazione del rischio comprendono la conoscenza della patogenicità dell'agente infettante, delle modalità di trasmissione e dei fattori di rischio per chi viene in contatto con tali agenti, nonché delle sorgenti e delle vie di infezione. Le strategie per la prevenzione e la gestione delle infezioni associate al laboratorio sono basate sul contenimento degli agenti infettanti mediante la loro separazione fisica dall'ambiente e dagli operatori del settore, l'informazione del personale circa i rischi occupazionali e la disponibilità di un programma di educazione sanitaria adeguato. Il rispetto delle linee guida fornite dal decreto legislativo 626/94 e i continui aggiornamenti riducono fortemente il rischio di una esposizione occupazionale agli agenti infettanti manipolati nei luoghi di lavoro.

Ci occuperemo in questa sede di rischio biologico.

Saranno descritte le principali strumentazioni e le operazioni che possono essere fonte di rischio biologico e si cercherà di fornire alcuni suggerimenti su come eseguire le procedure per ridurre al minimo le possibilità di contaminazione.

Nella seconda parte saranno descritte le più frequenti modalità di infezione e di trasmissione delle malattie; saranno infine descritte le principali attrezzature progettate per contenere i rischi di contaminazione e le procedure da compiere per ridurli o eliminarli del tutto

Rischi legati alla manipolazione di materiale biologico.

I rischi di contaminazione da agenti biologici, molto frequenti nei laboratori di ricerca sono stati definiti "biorischi". Il personale che opera nei laboratori è esposto ad un particolare rischio occupazionale: quello di venire a contatto con microrganismi che causano un'ampia un'ampia varietà di malattie. Le vie principali di trasmissione includono l'inoculazione percutanea o permucosa (comprendente l'esposizione cutanea o mucosa, clinicamente inapparente, a sangue o emoderivati), l'inalazione e l'ingestione.

Rischio biologico

Per rischio biologico s'intende quello di contrarre una malattia infettiva, ossia una forma morbosa, determinata da un agente biologico capace di penetrare, moltiplicarsi e produrre effetti dannosi in un organismo vivente, e che successivamente è in grado di allontanarsi da esso e di penetrare in altri organismi.

Tra le malattie infettive si distinguono quelle molto diffusive, che hanno tendenza a propagarsi molto rapidamente tra la collettività e quelle poco diffusive che restano circoscritte di solito al soggetto colpito.

Con il termine contaminazione s'intende la presenza di microrganismi patogeni in una determinata area e il loro contatto con le superfici corporee. La sola contaminazione non è sufficiente ad indurre uno stato d'infezione né una condizione di malattia. Una volta avvenuta la contaminazione, per arrivare all'infezione è necessario che i germi superino l'ostacolo costituito dalla cute e dalle mucose, e penetrino nell'organismo.

L'infezione è la penetrazione degli agenti patogeni nell'organismo.

Lo stato di malattia segue l'infezione dopo un tempo variabile, che prende il nome di periodo d'incubazione.

Contaminazione → infezione → incubazione → malattia.

Perché possa insorgere una malattia infettiva, devono concorrere una serie di fattori; alcuni propri dell'agente infettante, quali la virulenza e la carica infettante, altri propri dell'organismo ospite, come l'età, la costituzione, il sesso e la razza. Infine altri fattori dipendono dalle condizioni esterne, come il clima e la situazione ambientale.

Quanto più virulenti saranno i microrganismi e quanto più cospicuo sarà il loro numero, tanto più facilmente essi avranno il sopravvento sulle difese immunitarie e daranno luogo al passaggio dallo stato d'infezione a quello di malattia.

Definizione di materiale biologico

I materiali biologici sono costituiti da liquidi organici da sottoporre ad analisi (sangue, urine, feci, escreti, liquidi cavitari, essudati), colture batteriche, colture cellulari in virologia. Tutti questi materiali sono una fonte invisibile di rischio perché costituito da agenti biologici di dimensioni microscopiche (funghi, batteri, virus, rickettsie) che, durante le fasi di lavoro, possono essere facilmente disseminati con varie modalità all'interno del laboratorio.

Per definire con maggior accuratezza i vari tipi di materiale biologico, è possibile adottare le definizioni fornite nel 1991 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e riprese anche dalla Circolare

n°16 del 20 luglio 1994 del Ministero della Sanità in relazione alla “Spedizione di materiali biologici deperibili e potenzialmente infetti”, che hanno suddiviso i tipi di materiale biologico in tre categorie.

1) Sostanze infette. Sono quelle che contengono microrganismi vitali, compresi batteri, virus, rickettsie, parassiti, funghi, o microrganismi ricombinanti o mutanti che sono conosciuti provocare malattie negli animali e nell'uomo. In queste definizioni non sono incluse le tossine che non contengono sostanze infette.

2) Campioni Diagnostici. Sono costituiti da qualsiasi materiale di origine animale o umana, inclusi escreti, secreti, sangue e derivati, tessuti che sono spediti a scopo diagnostico, con esclusione di animali vivi infetti.

3) Prodotti biologici. Sono definiti come prodotti biologici finiti, per uso umano o veterinario, quelli fabbricati in conformità a quanto stabilito da Enti Ufficiali Nazionali o secondo le direttive dell'Autorità di Sanità Pubblica. I vaccini vivi per gli animali o per l'uomo sono considerati “prodotti biologici” e non “sostanze infette”.

Sorgenti d'infezione

Un contagio può avvenire o per trasmissione diretta (passaggio dal soggetto — uomo o animale — malato o portatore all'individuo sano), o per trasmissione indiretta (tramite veicoli o vettori). I veicoli sono costituiti da substrati inerti, quali acqua, alimenti, aria, oggetti di uso comune, come biancheria, stoviglie, posate, ferri chirurgici e materiale da lavoro che vengono a contatto con il soggetto malato.

La contaminazione del suolo può verificarsi o per l'uso di acque nere come concime, o attraverso materiali di rifiuto. Essa può costituire a sua volta il primo stadio di contaminazione delle falde acquifere. La contaminazione delle acque può essere diretta, mediante il riversamento di sostanze luride nelle riserve acquifere naturali o artificiali, o indiretta, attraverso la contaminazione del suolo. La contaminazione degli alimenti può avvenire mediante la loro preparazione con l'uso di acque infette.

I vettori sono organismi pluricellulari che possono aver assunto i parassiti sia da secreti ed escreti infetti sia direttamente mediante puntura del malato, e sono in grado di trasportarli fino a farli pervenire agli individui sani. I vettori possono essere distinti in facoltativi o obbligati. I primi, definiti anche vettori meccanici, come ad es. le mosche, trasportano l'agente infettante dalla fonte d'infezione e lo diffondono. I vettori obbligati, invece, sono rappresentati da alcuni artropodi specifici nei quali il parassita va incontro ad una evoluzione biologica che ne completa il ciclo vitale. Tipico esempio è la zanzara *Anopheles* per il *Plasmodium falciparum* agente della malaria o il pidocchio dei vestiti per la *Rickettsia prowazeki* che causa il tifo esantematico.

Gli agenti patogeni, essendo parassiti, non sempre trovano nell'ambiente esterno all'ospite le condizioni idonee alla loro sopravvivenza. Questa dipende sia dalle caratteristiche della specie, quindi dalla capacità di adattamento all'ambiente, o di produrre spore, sia dai materiali con i quali i microrganismi si allontanano dai soggetti contagiati; le sierosità ematiche, i materiali fecali, le albumine coagulate costituiscono involucri protettivi dall'ambiente esterno che possono prolungare la vitalità dei germi infettanti.

Il destino degli agenti patogeni che pervengono su un corpo inerte, esposto alla luce solare, è diverso da quello di agenti patogeni che vengono a trovarsi in un ambiente favorevole, in cui le

condizioni di adeguata umidità e l'assenza di luce contribuiscono alla conservazione delle sue capacità vitali.

La temperatura, la luce solare, l'essiccamento, la concorrenza vitale con altri microrganismi, ad es. saprofiti, sono tra i fattori critici per la sopravvivenza. La percentuale di acqua presente nel protoplasma batterico deve mantenersi costante; la sua diminuzione rappresenta un grave insulto all'integrità del microrganismo e, se non interviene un meccanismo di difesa come la formazione di spore o la protezione con materiali organici, può verificarsi la morte del microrganismo stesso.

La luce solare ha azione eccitante sul metabolismo cellulare ed esplica la sua massima azione nella zona UV. Gli UV sono attenuati dai vetri, quindi l'azione battericida da parte dei raggi solari si esplica pienamente quando essi giungono direttamente sul materiale infetto.

L'esposizione a +60°C per un'ora risulta letale per la maggior parte dei microrganismi in forma vegetativa.

Classificazione degli agenti biologici

Per microrganismo, s'intende qualsiasi entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o trasferire materiale genetico ad un altro essere vivente; come coltura cellulare si definisce il risultato della crescita in vitro di batteri o di cellule derivate da organismi superiori. Per agente biologico, invece, si intende qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni (art. 74 D.Lgs 626/94).

In accordo con l'art.75 del D.L. 626 /94 e sulla base delle indicazioni fornite dal National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) degli USA, gli agenti che costituiscono una fonte di rischio biologico sono stati suddivisi in 4 classi a seconda del rischio di infezione:

Agenti biologici di classe 1: la classe comprende tutti i microrganismi che possono essere manipolati senza particolari protezioni perché presentano poche probabilità di causare malattie nell'uomo (tutti gli agenti batterici, funghi virali, le rickettsie, le clamidie e i parassiti non compresi nelle classi di rischio 2, 3 e 4).

Agenti biologici di classe 2: sono gli agenti che possono rappresentare un rischio per gli operatori in quanto possono causare malattie di gravità variabile se vengono inoculati, iniettati o comunque se penetrano nella cute; è poco probabile che si propaghino nelle comunità e per essi sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (ad es Staphylococcus aureus, C.Tetani, B pertussis, N. meningitidis, N. gonorrhoeae)

Agenti biologici di classe 3: sono gli agenti che possono causare malattie gravi nell'uomo e sono quelli che costituiscono un serio rischio per gli operatori del settore. Essi possono propagarsi nella comunità, pertanto la loro manipolazione richiede particolari cautele (ad es. HBV, HCV, HIV, S. typhi). L'area dove essi sono manipolati deve essere nettamente distinta dagli altri locali del laboratorio e deve essere accessibile unicamente al personale abilitato. Tutte le operazioni devono effettuarsi in apposite cappe biologiche di classe II (vedi oltre).

Agenti biologici di classe 4: sono organismi che richiedono rigorosissime norme di protezione per la loro manipolazione perché la loro diffusione nell'ambiente può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità e può causare epidemie gravi nell'uomo; essi costituiscono un rischio molto grave per gli operatori del settore soprattutto perché, di norma, per essi non sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche (virus Ebola, Variola, Crimea-Congo, ecc.).

Nel caso in cui un agente biologico non possa essere classificato in modo inequivocabile in uno dei quattro gruppi sopraindicati, esso deve essere considerato come appartenente al gruppo di rischio più elevato.

Per determinare la pericolosità di un agente biologico devono essere considerate le seguenti caratteristiche:

l'infettività, intesa come la capacità di un microrganismo di penetrare e moltiplicarsi nell'ospite;

la patogenicità: capacità di un microrganismo di produrre malattia in seguito all'infezione;

la trasmissibilità: capacità di un microrganismo di essere trasmesso da un soggetto infetto ad uno suscettibile;

la neutralizzabilità: disponibilità di efficaci misure profilattiche per prevenire la malattia o terapeutiche per la sua cura.

Vie di penetrazione nell'organismo

Le sorgenti di infezione sono costituite da ospiti umani o animali attraverso i quali i microrganismi patogeni possono diffondersi. I serbatoi rappresentano l'habitat naturale in cui gli agenti patogeni vivono e si moltiplicano incessantemente, mantenendo o esaltando le loro caratteristiche di virulenza.

Dalla fonte di infezione il microrganismo può diffondersi ed infettare l'ospite attraverso varie modalità di penetrazione.

La via più frequente è costituita dalla cute che presenti delle soluzioni di continuo e dalle mucose. Una classica via di penetrazione per alcune malattie enteriche è costituita dall'anello linfatico di Waldeyer che si trova nella faringe. Le mucose bronchiali e polmonari, invece, costituiscono la porta d'ingresso per quei microrganismi che trovano nella diffusione aerea la loro principale via di disseminazione.

Durante il processo infettivo nel corso di malattia, i microrganismi possono essere allontanati all'esterno attraverso i secreti e gli escreti. Nelle malattie enteriche essi sono eliminati mediante le deiezioni fecali. Nelle affezioni polmonari essi saranno allontanati mediante le secrezioni bronchiali. Nelle infezioni a carico dei reni e della vescica, saranno allontanati attraverso le urine. Talvolta si verifica liberazione degli agenti infettanti anche attraverso il secreto di alcune ghiandole esocrine (nel caso di brucellosi e tbc si ha eliminazione di germi, attraverso le ghiandole mammarie, con il latte).

Gli aerosol

La diffusione per via aerea rappresenta un importante veicolo di infezione per quelle forme morbose sostenute da microrganismi che colonizzano l'apparato respiratorio o che lo riconoscono

sia come via di ingresso che di eliminazione, e per quelle forme che pur interessando altri organi, sono sostenute da agenti che vengono eliminati solo in un determinato periodo dell'intero decorso della malattia attraverso la via respiratoria (poliomielite), o la via orale (streptococchi, virus dell'afte), o la saliva (rabbia, mononucleosi). L'aria svolge un ruolo importante anche nel primo stadio infettivo delle malattie esantematiche.

Il materiale che si allontana attraverso le vie respiratorie è costituito da una quantità più o meno grande di gocce e goccioline di diametro variabile da frazioni di 1 μm fino a 100-1000 μm sotto forma di aerosol.

Con ogni starnuto si eliminano in media 20.000 goccioline di diametro inferiore a 100 μm . Con ogni colpo di tosse si allontanano da 10 a 100 goccioline bronchiali, di diametro nettamente inferiore alle precedenti. Con il parlare si liberano gocce di diametro superiore a 100 μm .

L'aerosol che si allontana con questi meccanismi è costituito anche da materiale mucoso inglobante particelle solide, leucociti, residui epiteliali e cellule di sfaldamento. Nel caso in cui l'aerosol provenga da soggetti colpiti da infezione delle prime vie aeree, esso contiene anche i relativi agenti patogeni.

Il destino di queste goccioline e la loro capacità di agire come veicolo d'infezione cambia in base alla loro dimensione alla loro permanenza nell'aria, e alle condizioni di temperatura, luce e umidità.

Le goccioline più piccole, di diametro inferiore a 100-150 μm , nell'aria vanno incontro in brevissimo tempo ad una rapida disidratazione; sono così destinate ad evaporare in un tempo inferiore ai 2-3 secondi, che è il tempo richiesto per raggiungere il terreno dalle goccioline emesse con uno starnuto da un individuo di altezza media e in posizione eretta.

I residui del materiale disciolto nelle goccioline sono in grado di rimanere in sospensione nell'aria come particelle, che prendono il nome di nuclei delle goccioline o "droplet-nuclei".

A differenza delle goccioline, i droplet-nuclei rimangono nell'atmosfera per un tempo molto più lungo, per ore o addirittura per giorni, a causa del loro peso irrilevante sul quale la gravità agisce assai modestamente; essi, trasportati dai movimenti dell'aria, si spostano a distanze ragguardevoli diffondendo il contagio anche in ambienti diversi da quello della sorgente di emissione. Essi prendono il nome di particelle aerogene primarie.

Poiché la formazione del nucleo della gocciolina richiede pochi millesimi di secondo, i microrganismi sospesi nell'aerosol espulso diventano parte del nucleo della gocciolina. In presenza di umidità ambientale elevata, i "droplet nuclei" agiscono da nuclei di condensazione del vapore acqueo. La sopravvivenza dei microrganismi nel nucleo della gocciolina è importante nel caso d'infezioni trasmesse attraverso l'aerosol. Per molti microrganismi l'evaporazione della gocciolina è immediatamente microbica. Nel caso di *E. coli* ad esempio, solo il 10% di essi sopravvive durante il passaggio da gocciolina al droplet-nucleo e solo una parte di questo 10% sopravvive successivamente. Il *Mycobacterium tuberculosis*, invece, con la sua protezione cerosa risulta molto più resistente: oltre il 90% di questi microrganismi sopravvive in questa fase. In una coltura esso dà origine a colonie secche che facilmente si disperdono nell'aria. Una volta entrato a far parte del nucleo della gocciolina, esso, in un ambiente scuro, a determinate condizioni di temperatura e di

umidità, è in grado di sopravvivere per mesi. Alla luce del sole invece esso viene rapidamente ucciso dalla radiazione U.V.

Le goccioline con diametro superiore a 150 μm hanno un rapporto superficie/volume più piccolo; questo fatto non permette una rapida evaporazione, pertanto le goccioline più grandi cadono al suolo, oppure aderiscono alle superfici, o diventano parte della polvere ambientale. Dunque l'allontanamento di goccioline infette di diametro elevato (100-200 micron e oltre), dà luogo ad una contaminazione dell'aria di brevissima durata. Dette goccioline, in rapporto alla spinta dinamica e alla gravità, compiono un tragitto che non supera i 10-13 metri e sedimentano nel giro di pochi secondi. Se durante questo percorso esse incontrano un ospite recettivo, possono diffondere il contagio, che va considerato come avvenuto per trasmissione diretta, da malato a sano.

Altra modalità di trasmissione aerea è legata alla risospensione nell'aria del materiale essiccato e delle polveri contaminate che derivano dalle grosse goccioline sedimentate rapidamente sul pavimento che possono essere rimesse in sospensione nell'aria da successive forze fisiche. Queste polveri risospese prendono il nome di particelle aerogene secondarie e l'infezione che esse trasmettono dipende dalla notevole resistenza all'essiccamento degli agenti contaminanti.

Per trasmettere una malattia, gli agenti patogeni presenti nella polvere devono essere in grado di sopravvivere sino a quando non vengono in contatto con un nuovo ospite. Inoltre essi, dopo averlo infettato, devono essere in grado di moltiplicarsi e raggiungere gli organi bersaglio.

La dimensione delle goccioline determina il loro destino. La possibilità di indurre infezione da parte delle particelle diffuse nell'aria è collegata con la facilità con cui esse sono inalate e trattenute. La ritenzione a livello alveolare è direttamente legata alla grandezza del pulviscolo ed è massima (75%) per le particelle comprese tra 1-2 μ e 2-5 μm ; quelle di diametro superiore a 5-6 μm vengono arrestate dalle strutture anatomiche che tappezzano le prime vie respiratorie. Nel caso di particelle del diametro tra 0,1 e 1 μm , esse, pur penetrando facilmente, altrettanto facilmente vengono espulse. Il pulviscolo di diametro minore di 0,1 μm , con i suoi movimenti browniani, viene trattenuto a livello alveolare provocando una condizione di rischio. Le particelle più grandi che raggiungono le vie aeree superiori sono espulse con i movimenti muco-ciliari. Esse per poter produrre l'infezione devono raggiungere gli alveoli e devono pertanto far parte del "nucleo della gocciolina" che ha un diametro inferiore a 5 μm di diametro.

Se diversi microrganismi sono contenuti in un agglomerato il cui diametro supera 5 μm , essi hanno difficoltà a raggiungere gli alveoli polmonari. Particelle più grandi sospese nell'aria, che sono inalate attraverso il naso, sono costrette a compiere un percorso sinuoso e complesso e vanno a depositarsi sulle superfici delle mucose più periferiche. Se le mucose delle prime vie aeree sono sensibili ai microrganismi contenuti in queste particelle si può avere infezione.

L'infezione da droplet si verifica se nello stesso ambiente si trovano sia la sorgente di infezione (malato o portatore) che l'ospite recettivo.

Dunque rientra nel caso di trasmissione diretta, essendo il percorso attraverso l'aria estremamente rapido e limitato nello spazio (tbc polmonare, meningite cerebrospinale endemica, malattie esantematiche infantili, difterite, peste polmonare, rabbia).

In sintesi, la diffusione per via aerea delle malattie infettive può attuarsi per:

- trasmissione diretta tramite l'aria dalla sorgente di infezione all'individuo sano e recettivo attraverso le goccioline umide.
- 2) trasmissione indiretta attraverso i "droplet-nuclei", che consente una diffusione a distanza notevole e per diverso tempo anche in assenza della sorgente di infezione.
- 3) trasmissione mediante risospensione di polveri contaminate derivate dall'essiccamento delle grosse goccioline depositate sulle diverse superfici dell'ambiente in cui soggiorna la sorgente di infezione.

La voce 1) è da considerarsi trasmissione da contatto. Le voci 2) e 3) rappresentano infezioni aerodiffuse sostenute da particelle aerogene primarie (droplet nuclei) o da particelle aerogene secondarie (polveri risospese) Fig. 1.

INFEZIONI AERODIFFUSE
FORMAZIONE DI PARTICELLE AEROGENE
TOSSE, STARNUTI, FONAZIONE USO DI STRUMENTI
CHE PROVOCANO FORMAZIONE DI AEROSOL

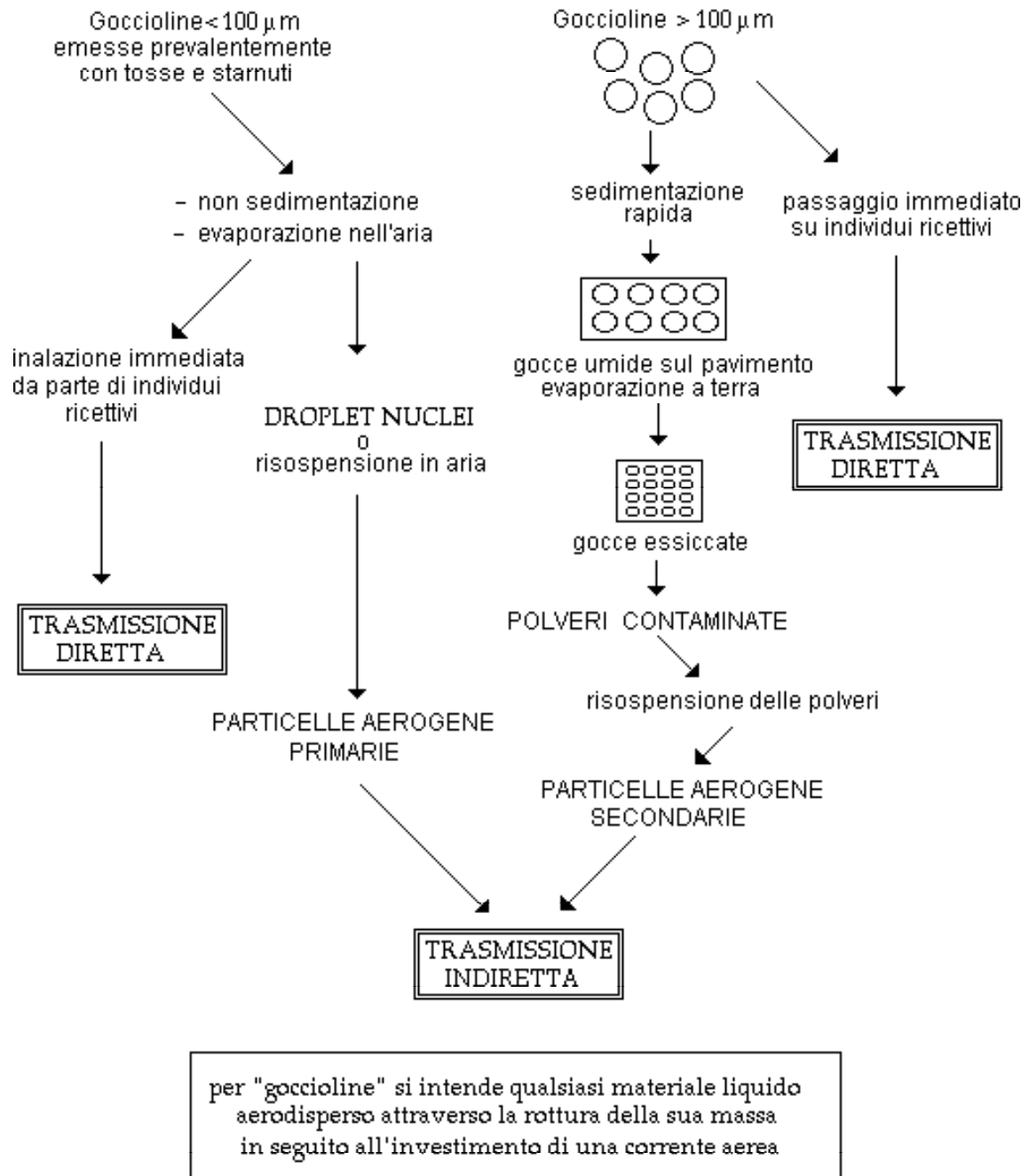


Fig1: formazione di particelle aerogene

Gli aerosol prodotti in un laboratorio

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

1) Inoculazione di materiale infetto attraverso la cute: si verifica sempre per cause accidentali e quindi facilmente identificabili: punture con l'ago di siringhe contenenti materiale infetto; abrasioni, tagli e ferite che vengano a contatto con materiale, polvere o superfici infette; lacerazioni causate da frammenti di vetreria rotta contaminata; morsi o graffi di animali di laboratorio infettati sperimentalmente.

2) Ingestione di materiale infetto: può avvenire sia per aspirazione diretta di liquidi infetti durante la pipettatura a bocca che per contaminazione delle mani e delle dita, con conseguente larga disseminazione di materiale infetto all'interno del laboratorio.

3) Aerosol: la disseminazione sotto forma di aerosol rappresenta una rilevante fonte di dispersione nell'atmosfera di materiale infetto e costituisce una delle più frequenti modalità di contaminazione ambientale, tanto più pericolosa in quanto spesso non sospettata e non facilmente dimostrabile.

L'aerosol si può formare nel momento dell'apertura di contenitori, di provette e capsule di Petri o di fiale contenenti materiale liofilizzato; nell'impiego di agitatori, siringhe, centrifughe; nello svuotamento di pipette, nella sterilizzazione alla fiamma di anse o aghi bagnati.

E' indispensabile cercare di evitare la formazione di aerosol adottando gli appositi mezzi ideati a questo scopo e attenendosi alle corrette norme antisettiche.

I microrganismi trasportati con gli aerosol costituiscono una notevole sorgente d'infezione, soprattutto per le vie respiratorie, e rappresentano un rischio spesso sottovalutato nei laboratori in cui si manipola materiale biologico.

Ricerche condotte in numerosi laboratori per periodi di tempo variabili da 1 a 4 anni hanno dimostrato che in circa il 70% delle infezioni contratte in laboratorio non era possibile identificare una causa accidentale riconosciuta (come per es. l'inoculazione attraverso la cute o ingestione): questa osservazione ha promosso una serie di studi sulla possibilità di generazione di aerosol infetti.

Studi sulla trasmissione delle malattie mediante aerosol fanno riferimento a speciali tecniche fotografiche messe a punto per la prima volta nel 1938 da due ricercatori tedeschi, Weyeranch e Rzymkowski. Esse sono in grado di evidenziare l'aerosol prodotto quando un individuo starnutisce, tossisce o parla. Si deve però alle esperienze di Carl Flügge, illustre igienista e batteriologo tedesco, la prima dimostrazione nel 1897 della diffusione nell'ambiente di microrganismi presenti nella cavità orale. Soggetti volontari furono invitati a tossire e starnutire previa gargarizzazione con microrganismi cromogeni (*Serratia marcescens*). A varie distanze dai soggetti erano predisposti una serie di recipienti coperti, contenenti un terreno di coltura idoneo per lo sviluppo di questi microrganismi. La crescita di *Serratia marcescens* nei terreni si riscontrò fino ad una distanza di 10-13 metri dai volontari, dimostrando la diffusione delle goccioline e, con queste, dei microrganismi, in seguito all'impulso dinamico ricevuto con la tosse e con gli starnuti.

Tutte le tecniche di laboratorio, anche le più comuni, provocano la formazione di aerosol.

Può essere istruttivo per il personale che opera in un laboratorio di ricerca fare un raffronto tra l'aerosol generato durante le attività svolte quotidianamente e quello prodotto con lo starnutire, il tossire o con la fonazione in particolare nella pronuncia dei suoni o fonemi dentali, che provocano il riversarsi nell'ambiente di particelle di saliva e di muco.

In un laboratorio, numerose operazioni di manipolazione di microrganismi in sospensione in un liquido producono goccioline simili a quelle generate dai colpi di tosse.

Procedimenti quali l'uso di agitatori, pipette e sonicatori producono aerosol. In molte di queste procedure si riescono ad evidenziare solo le goccioline più grandi nel materiale vaporizzato.

Alcune di esse, quando raggiungono una superficie dura, possono suddividersi in particelle più piccole, creando a loro volta la formazione di aerosol. Visibili segni di schizzi, quindi, devono essere considerati come indicatori della presenza di goccioline invisibili.

Pertanto si deve procedere rapidamente ad asciugare gli schizzi per eliminare una possibile fonte di contaminazione. Il rischio nascosto nella manipolazione di una coltura in un mezzo liquido è spesso sottovalutato, mentre viene posta attenzione maggiore nel manipolare colture cellulari o colonie batteriche che crescono su terreno solido. Le sospensioni liquide, invece, producono facilmente nuclei di goccioline e rappresentano pertanto un rischio maggiore, dovuto alla presenza di microrganismi sospesi nel fluido, in particolare quando si ha a che fare con microrganismi resistenti come ad es. i micobatteri.

Classificazione degli aerosol

Sono stati riconosciuti e classificati vari tipi di aerosol:

Aerosol prodotti dalle correnti di ventilazione.

Le correnti di ventilazione si originano dai condizionatori d'aria, e possono permettere la disseminazione di microrganismi da ambienti ad alta contaminazione ad altri meno contaminati. Essi producono flussi d'aria direzionati che possono sollevare polvere contaminata dalle superfici dei banchi di lavoro e dirigerla verso il viso degli operatori.

Aerosol prodotti da effetti elettrostatici

La repulsione elettrostatica è stata impiegata come mezzo di generazione sperimentale di aerosol; infatti l'attrazione elettrostatica gioca un ruolo importante in alcuni tipi di apparecchi per la campionatura dell'aria e per la misurazione dell'efficienza dei filtri. Gli effetti elettrostatici, quindi, possono rappresentare un potenziale rischio sia per la produzione di aerosol che per la contaminazione di superfici

Aerosol prodotti dalla manipolazione del materiale biologico

Gli aerosol che si producono durante le comuni operazioni di laboratorio sono importanti fonti d'infezione; pertanto si deve cercare di ridurre al minimo la formazione e la dispersione. Sia il normale utilizzo della strumentazione di laboratorio che le comuni tecniche di manipolazione del materiale biologico possono essere fonte di contaminazione e pertanto devono essere effettuate tenendo conto della necessità di proteggere sia l'ambiente che degli operatori

Poiché le particelle di aerosol più voluminose cadono immediatamente sulla superficie di lavoro, il rischio maggiore è costituito dalle particelle più piccole che rimangono in sospensione e inquinano l'ambiente.

Aerosol prodotti dagli apparecchi di laboratorio.

I rischi maggiori si corrono durante le operazioni che si compiono più frequentemente, soprattutto perché essendo svolte abitualmente, sono spesso trattate come operazioni di routine ed effettuate talvolta alla leggera, senza mettere in atto le procedure richieste per operare in condizioni di sicurezza.

Le principali fonti di contaminazione biologica sono costituite dalla frantumazione, la miscelazione, l'agitazione, lo scuotimento e la liofilizzazione di materiale biologico; dalla pipettatura di colture liquide, di sospensioni batteriche o di liquidi biologici, in particolare l'espulsione forzata del liquido dalla pipetta; dalla rimozione di tappi dai contenitori di liquidi biologici o di colture liquide o solide in cui si sia formata acqua di condensazione; dal flambaggio dell'ansa e dalla semina di colture su superfici ruvide; dall'allestimento di strisci di colture o di materiali su vetrini per l'osservazione microscopica. In generale l'uso di molti apparecchi di laboratorio come le centrifughe (in particolare per la rottura di contenitori in centrifuga con spandimento di materiale infetto), gli agitatori o i miscelatori di colture liquide, i termostati (in particolare quelli a ventilazione forzata) e le autoclavi per la sterilizzazione al calore umido può produrre all'interno dei contenitori del materiale nebulizzato che può liberarsi nell'ambiente.

Agitatori scuotitori e miscelatori per colture

Durante tutte le operazioni di agitazione o di miscelazione di colture liquide o di sospensioni batteriche, nei relativi contenitori si formano notevoli quantità di aerosol, schizzi e gocciolamenti. Esse pertanto devono essere eseguite in cappa di sicurezza biologica o altro mezzo di contenimento primario progettato appositamente.

Qualora fossero disponibili solo box con cappa di aspirazione, ad agitazione ultimata, occorre attendere un periodo di circa 10-15 minuti prima di aprire il box.

La rottura di un contenitore durante i processi di agitazione o di miscelazione rappresenta uno dei più comuni incidenti di laboratorio e costituisce uno dei principali rischi di contaminazione ambientale, a causa della massiccia quantità di aerosol che si libera. Quindi, occorre attendere almeno 30 minuti, che sono il tempo sufficiente perché le particelle più voluminose di aerosol si depositino, prima di procedere al recupero dei frammenti dei contenitori e del contenuto residuo per sterilizzarli in autoclave; se non è possibile sterilizzare subito, si consiglia di immergere i frammenti in una soluzione di disinfettante e decontaminare il piano di lavoro e la strumentazione con un disinfettante; è preferibile usare un composto fenolico. L'ipoclorito di sodio è sconsigliato per la sua azione corrosiva sulle parti metalliche.

Se l'agitatore è collocato in una cabina di sicurezza, il flusso laminare provvede ad eliminare le particelle più piccole di aerosol; se è collocato in un box con semplice cappa di aspirazione è opportuno provvedere alla decontaminazione dell'aria con un disinfettante gassoso o sotto forma di nebulizzazione.

Agitazione con vortex.

Sottoporre ad agitazione solo provette infrangibili, con tappo a vite, chiuse ermeticamente. Ultimata l'agitazione, capovolgere lentamente le provette in modo che l'aria si mescoli con il liquido per riassorbire le particelle vaporizzate. Lasciar riposare le provette prima della loro apertura.

L'apertura di contenitori con tappo a pressione provoca facilmente la fuoriuscita di aerosol. Così pure un'incauta rimozione del tappo di un contenitore agitato di recente, prima della completa sedimentazione del liquido, determina fuoriuscita di aerosol. Ciò è particolarmente evidente in caso di agitazione violenta. Per contenere il diffondersi di aerosol è opportuno adottare matracci per colture di vetro robusto con tappi a vite o a pressione, dotati se necessario di filtri alle aperture, e ben chiusi.

Omogenizzatori e frantumatori di tessuti.

Possono produrre aerosol o perdite di materiale infetto. Il tradizionale omogenizzatore a lame rotanti, tipo frullino, rappresenta una comune fonte di produzione e diffusione di aerosol. Gli omogenizzatori domestici non possiedono contenitore a tenuta ermetica e liberano una gran quantità di goccioline microscopiche. Per minimizzare questo rischio si devono utilizzare solo modelli di apparecchi progettati per l'uso in laboratorio, che sono costruiti in modo tale da evitare perdite dai supporti del rotore e dalle guarnizioni ad anello.

In alternativa si consiglia la loro sostituzione con un omogenizzatore/estrattore batterico a battuta, detto "stomacher", dove il campione rimane sempre protetto in un sacchetto di plastica sterile. Quando la preparazione del campione prevede l'uso di lame, si deve adottare un sistema chiuso a tenuta ermetica, con l'accortezza di utilizzarlo ed aprirlo in una cappa di sicurezza biologica. Prima di aprire un miscelatore, occorre attendere almeno 10 minuti per permettere agli aerosol di depositarsi. Oppure si può far raffreddare la sospensione per consentire agli aerosol di condensarsi.

Centrifughe

Il rischio principale nell'uso delle centrifughe è costituito dalla liberazione delle massicce quantità di aerosol e schizzi che si producono durante la centrifugazione di un liquido o nel caso di rottura delle provette. Le centrifughe devono perciò essere collocate in cabine di sicurezza o, in mancanza di queste, in box chiusi.

Gli alloggiamenti per le provette della centrifuga dovrebbero essere a tenuta e realizzati con metalli resistenti alla corrosione (contenitori di sicurezza).

Le provette e i flaconi da centrifuga dovrebbero avere una parete spessa, essere infrangibili ed essere testati per una corretta resistenza meccanica o fisica alle forze cui essi sono sottoposti durante la centrifugazione. Dovrebbero inoltre essere dotati di tappi a chiusura ermetica, preferibilmente a vite, che siano in grado di evitare il rischio di perdite di liquido durante la centrifugazione, anche alle massime velocità consentite, e fare da barriere all'aerosol anche durante l'apertura delle provette.

Sono consigliabili opportuni sistemi di chiusura costituiti da due parti: un tappo a vite in polipropilene ed una guarnizione fissa in silicone. Le due parti sono sigillate tra loro e pertanto non sussiste il rischio di smarrimento o di mancato allineamento.

Le provette da centrifuga dovrebbero avere una capacità di circa 30 ml, ed essere riempite per non oltre 2/3 della loro capacità, evitando accuratamente di contaminare l'orlo della provetta o il tappo. Le provette dovrebbero essere riempite e svuotate sotto una cappa a flusso laminare. Dopo essersi assicurati che il tappo a vite sia perfettamente chiuso, è consigliabile collocare la provetta in un sacchetto di plastica e sigillare quest'ultimo al disopra del tappo con un elastico. Questo

accorgimento limita la dispersione dei materiali contaminati in caso di rottura della provetta. Prima di collocare la provetta all'interno della centrifuga, occorre assicurarsi che il tampone di gomma posto sul fondo nell'alloggiamento sia sistemato in modo corretto.

A centrifugazione ultimata trasferire i cestelli da centrifuga in cappa di sicurezza biologica.

Durante la decantazione del surnatante, travasare il liquido in contenitori a tenuta, eventualmente utilizzando imbuto di sicurezza che dovranno essere risciacquati poi con un disinfettante.

In caso di rottura delle provette durante la centrifugazione, valgono gli stessi accorgimenti indicati per la rottura dei contenitori durante le operazioni di agitazione e miscelazione di colture o sospensioni batteriche.

I contenitori per le provette, il coperchio e le altre parti della centrifuga devono essere disinfettati giornalmente o a intervalli di tempo ravvicinati, per eliminare la contaminazione dovuta alle particelle più voluminose degli aerosol prodotti durante la centrifugazione, che tendono a depositarsi all'interno dello strumento. Ispezionare la superficie delle provette per accertare eventuali perdite di liquido e disinfettare immediatamente in caso di contaminazione evidente. Controllare periodicamente le guarnizioni di tenuta e sostituirle ad intervalli regolari. Quando è possibile, è opportuna la sterilizzazione in autoclave delle varie parti della centrifuga.

Sarebbe opportuno tenere un registro delle ore di operazione svolte da ciascun rotore e istituire un accurato programma di manutenzione preventiva, con regolari ispezioni che verifichino l'integrità di tutte le parti della centrifuga (assenza di segni di corrosione, o di fessurazione del coperchio) per ridurre i rischi di guasti meccanici.

Nel caso delle ultracentrifughe, si consiglia di installare un filtro HEPA tra la centrifuga e la pompa da vuoto.

Termostati

I comuni termostati con forno elettrico a convezione termica non presentano il rischio di generare aerosol; determinano, invece, attraverso le correnti d'aria che si liberano all'interno durante il funzionamento, una rapida disseminazione di materiali eventualmente gocciolanti, o di crescite batteriche esuberanti all'interno delle piastre o delle provette di coltura. E' necessario perciò che la circolazione forzata dell'aria sia interrotta automaticamente, con un meccanismo di blocco, all'apertura della porta del termostato. E' stato dimostrato che le piastre di plastica generano una quantità di aerosol di gran lunga inferiore a quella che si forma con le piastre di vetro.

I termostati devono essere decontaminati di frequente con un disinfettante idoneo e devono essere sottoposti ad un'accurata manutenzione periodica.

Apparecchiature per il vuoto e liofilizzatori

I contenitori da sottoporre ad aspirazione forzata di aria per la formazione di vuoto devono avere le pareti spesse e il fondo arrotondato per evitare ogni possibilità di rottura, che rappresenterebbe un'importante fonte di contaminazione. I contenitori in vetro devono essere del tipo progettato per la formazione del vuoto. Prima del loro utilizzo verificare accuratamente l'assenza di incrinature superficiali.

E' necessaria la massima attenzione nell'uso della pompa da vuoto per evitare che, per variazioni brusche dell'aspirazione, per eccessivo riempimento del contenitore o per omissione di qualche

manovra nell'allestimento del sistema, il liquido sottoposto alla creazione di vuoto, spesso costituito da terreno di coltura, impregni il cotone del tubo d'innesto alla pompa o gli altri dispositivi di sicurezza. In questo caso l'aria in uscita dalla pompa produrrebbe aerosol contaminanti. Si consiglia di utilizzare guarnizioni ad anello per sigillare completamente l'apparecchiatura. Ad operazione ultimata, la variazione di pressione deve essere diminuita gradualmente e accuratamente prima di disinnescare la pompa. E' necessario verificare la corretta posizione del sistema di protezione del circuito del vuoto, costituito da un filtro a cartuccia con pori di 0,45 μm , che impedisce la contaminazione dell'apparato dalle particelle di aerosol. La bottiglia per la raccolta dei liquidi in eccesso deve contenere un disinfettante appropriato. Si può usare un bulbo di gomma per chiudere automaticamente il circuito del vuoto quando la bottiglia è piena. L'intera unità deve essere autoclavabile. Si consiglia di utilizzare una trappola per l'umidità e un condensatore del vapore di costruzione interamente metallica.

Pipette

I rischi più comuni legati al pipettare derivano dalla suzione con la bocca. Essi sono costituiti dall'aspirazione e dall'ingestione di materiale infetto, che rappresentano la causa di molti incidenti e infezioni da laboratorio. Per questo motivo, tutte le pipette devono essere dotate, nella parte prossimale, di un batuffolo di cotone che trattenga eventuali risucchi di materiali.

Gli agenti patogeni possono raggiungere la bocca anche se l'estremità di suzione di una pipetta viene in contatto con un dito contaminato. Un rischio meno noto del pipettare a bocca è l'inalazione degli aerosol prodotti dalla suzione. Il batuffolo di cotone, in presenza di una pressione negativa o positiva, non è un filtro assolutamente efficace, tanto che alcune particelle possono essere succhiate attraverso di esso. Se il batuffolo è infilato strettamente, sulla pipetta può venire applicata una suzione troppo violenta che può portare addirittura all'ingestione del batuffolo e anche del liquido magari infetto.

Aerosol possono essere generati anche quando un liquido gocciola dalla pipetta sulla superficie di lavoro, nonché quando le colture vengono mescolate aspirando e soffiando alternativamente e quando dal fondo di un contenitore viene aspirata l'ultima goccia di liquido. Infatti l'aria non deve essere mai fatta gorgogliare in liquidi contenenti agenti infetti o potenzialmente infetti.

Durante l'eliminazione forzata della goccia finale dalla pipetta, il liquido si frammenta per disperdersi in numerose, minuscole gocce, come comunemente avviene quando due superfici liquide vengono separate (per es. nelle tecniche di agglutinazione su vetrino, o nella fase di disinnescamento di un ago dalla siringa). Nelle operazioni di pipettatura le gocce vengono sempre lasciate cadere su un'altra superficie; essa può essere liquida o umida, se è costituita da altri liquidi, o solida è come ad es. quella dei terreni di coltura in agar; è quindi possibile che avvenga la caduta accidentale di qualche goccia sul banco di lavoro. All'impatto, la produzione di aerosol avviene in misura diversa secondo i casi. Venendo a contatto su superfici lisce e asciutte, la goccia si spande con poca tendenza a rimbalzare; nel caso in cui cada su superfici liquide, oppure umide ma solide, si produce una corona di particelle minute. La caduta sulla superficie di una quantità notevole di un altro liquido provoca un rimbalzo a forma di fontana. In tutti questi casi le gocce più voluminose, ricadendo sulle superfici, ripetono a loro volta lo stesso fenomeno, anche più volte.

La caduta di gocce su una superficie assorbente umida è relativamente sicura. E' consigliabile quindi coprire la superficie del banco di lavoro, in prossimità dell'operatore, con garze assorbenti umidificate ma non imbibite, con del disinfettante idoneo.

Fig. 2.

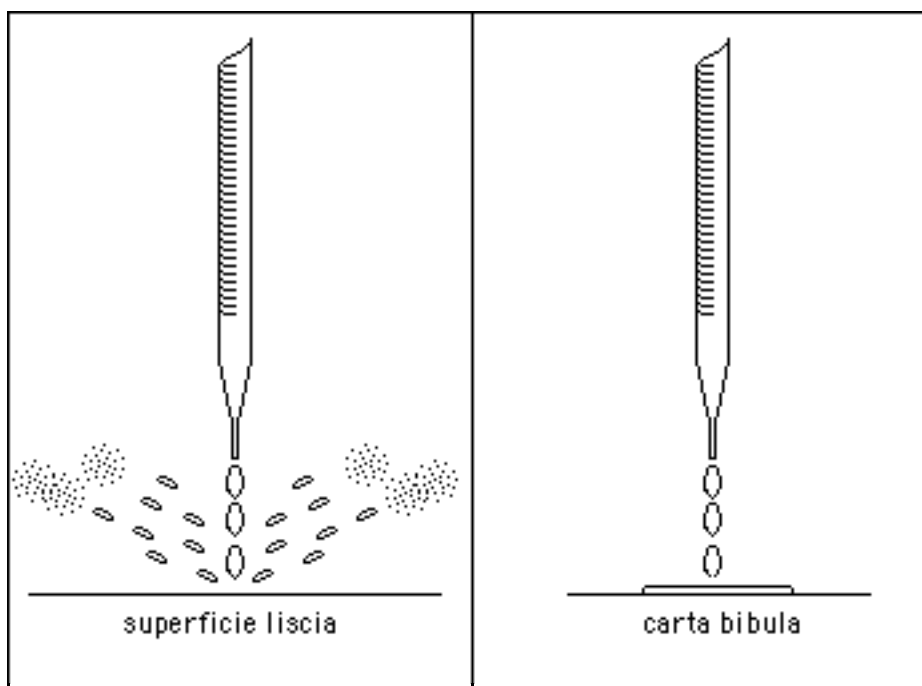


Figura 2: le gocce che cadono su una superficie liscia tendono a rimbalzare. Se cadono invece su un materiale assorbente non provocano formazione di aerosol.

Per non rischiare la dispersione accidentale di materiale infetto, occorre evitare accuratamente l'eliminazione forzata dell'ultima goccia di liquido dalla pipetta ed il contatto della punta della pipetta umida con il tappo e l'orlo della provetta.

Sarebbe preferibile eseguire sotto una cappa a flusso laminare tutte le operazioni di pipettatura di materiali infetti o di colture liquide. Le pipette contaminate devono essere scartate immediatamente dopo l'uso in un cilindro contenente del disinfettante; successivamente esse dovranno essere sterilizzate in autoclave prima di essere passate al lavaggio per essere riutilizzate.

La pipettatura a bocca è oggi largamente sostituita dall'adozione di propipette; per i rischi ricordati, l'aspirazione dei liquidi con le pipette mediante la suzione a bocca deve essere oggi tassativamente evitata. Si possono adottare delle micropipette con puntale monouso oppure degli aspiratori da vuoto.

Per piccole quantità di liquidi e per pipette da 1 ml, sono sufficienti le tettarelle di gomma che vengono comunemente utilizzate per i flaconi contagocce. Per quantità maggiori e per pipette da oltre 2 ml si possono utilizzare apposite propipette a doppia valvola di aspirazione ed espulsione. Sono anche disponibili in commercio pipette tarate da 2-3 ml in materiale monouso, sterili, fornite di un apposito bulbo di aspirazione.

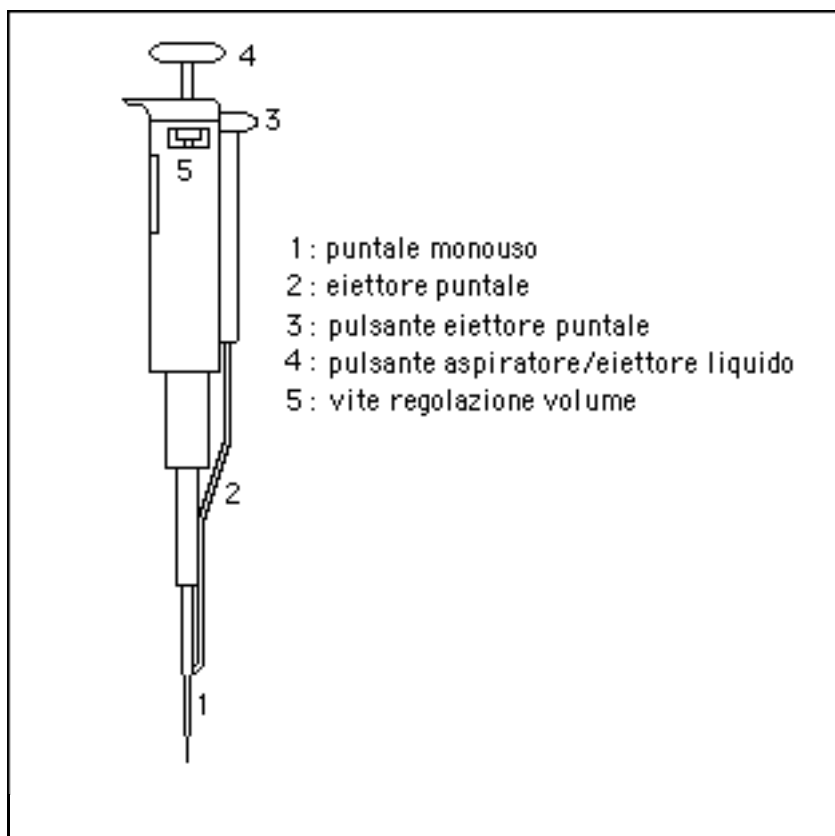


fig. 3 rappresentazione schematica di una propipetta.

L'importanza delle propipette non sarà mai abbastanza sottolineata. Esse hanno notevole facilità d'uso e vanno scelte con attenzione. La loro concezione e il loro utilizzo non devono creare ulteriori rischi di infezione. Esse devono possedere un sistema di controllo per eventuali perdite sulla punta della pipetta; devono poter essere pulite e sterilizzate facilmente. Le pipette con l'estremità di suzione sbeccata o incrinata non devono essere utilizzate perché danneggiano le guarnizioni della sede delle propipette, creando così una fonte di rischio.

Anse

La sterilizzazione di un'ansa metallica mediante flambatura può provocare la formazione di aerosol. Nel momento in cui un'ansa umida viene portata alla fiamma per essere sterilizzata, si produce un aerosol che si diffonde a nuvola rischiando di investire l'operatore e provocare la caduta sul banco di lavoro di particelle più voluminose e visibili macroscopicamente, oltre che inficiare i risultati analitici dell'esperimento in corso.

Sono stati studiati vari modelli di becchi Bunsen con sistemi di contenimento degli aerosol. Particolarmente pratici sono i modelli di microinceneritori protetti e dotati di un sistema di riscaldamento elettrico. Essi riducono al minimo gli schizzi e la dispersione di materiale infetto poiché sono costituiti da una camera cilindrica di terra refrattaria, chiusa ad una estremità, all'interno della quale deve essere introdotta l'ansa per poter essere sterilizzata; sono inoltre dotati di schermi di vetro borosilicato o di ceramica.

In situazioni di emergenza, qualora non si disponga di inceneritori protetti o di cabine di sicurezza, prima di flambare l'ansa, si consiglia di immergerla in una soluzione di disinfettante

In molte operazioni di laboratorio, anche l'uso improprio dell'ansa, in particolare durante la sua immersione in colture liquide, o in capsule Petri contenenti colonie in crescita su terreni solidi, può generare aerosol. L'ansa metallica usata per effettuare uno striscio deve avere l'asola completamente chiusa e non deve superare i sei cm di lunghezza. Un'ansa troppo lunga o con un occhiello troppo grande tende a disperdere nell'ambiente goccioline di aerosol. Per ovviare a questo pericolo si possono utilizzare anse monouso. Esse presentano il vantaggio di non dover essere sterilizzate alla fiamma e pertanto possono essere usate nelle cappe di sicurezza biologica, nelle quali i becchi Bunsen e i microinceneritori disturberebbero il flusso d'aria.

Dopo l'uso, le anse vanno immerse in una soluzione disinfettante.

In ogni caso, tutte le operazioni di trasferimento di colture o di semina di materiali infetti si dovrebbero essere eseguite all'interno di cabine di sicurezza.

Aghi ipodermici

Con l'uso degli aghi, in laboratorio si corre frequentemente il rischio di punture accidentali, o di versamenti del materiale biologico prelevato o del liquido da iniettare e, spesso, per una pressione eccessiva sul pistone, di formazione di aerosol. Pertanto si consiglia di utilizzare sistemi con ago bloccabile, per prevenire la sua separazione dalla siringa, o di servirsi di siringhe monouso in cui l'ago sia parte integrante della siringa stessa.

Effettuare il riempimento con attenzione per minimizzare il rischio di bolle d'aria e di schiuma nel fluido da inoculare. Evitare di utilizzare le siringhe per mescolare materiali infetti; nel caso in cui questo venga comunque fatto, assicurarsi che la punta dell'ago sia tenuta sotto la superficie del liquido ed evitare di esercitare una forza eccessiva sul pistone.

La solubilizzazione di materiale in polvere o liofilizzato è un'operazione che spesso si effettua introducendo, con una siringa, il liquido solvente nella boccetta del soluto, forando il tappo di gomma con il quale essa è chiusa. Completata l'operazione, prima di estrarre l'ago, si raccomanda di avvolgere l'ago e il tappo in un batuffolo di cotone inumidito con un disinfettante appropriato.

Prima di effettuare un inoculo, si raccomanda di espellere il liquido in eccesso, e le bolle d'aria presenti nella siringa, tenendo la siringa in posizione verticale, con l'ago inserito all'interno di una provetta contenente un batuffolo di cotone inumidito con del disinfettante.

E' vivamente sconsigliato, invece, puntare espressamente l'ago verso l'alto, come si osserva comunemente, e spingere il pistone fino al raggiungimento del volume desiderato, per eliminare nell'ambiente, spesso con un pittoresco zampillo, il liquido in eccesso.

Tutte le operazioni che prevedono la manipolazione di materiali infetti devono essere effettuate sotto una cappa di sicurezza.

Dopo l'uso, siringa e ago monouso devono essere scartati separatamente. Non si deve MAI ricoprire l'ago con il suo involucro di protezione, per evitare il rischio di punture accidentali. E' preferibile, invece, gettarlo in un contenitore a pareti rigide o infilarlo in un supporto di polistirolo da eliminare poi con le dovute precauzioni.

Dopo l'utilizzo delle siringhe di vetro, tutti i pezzi che la compongono dovranno essere immersi separatamente in una soluzione disinfettante, avendo cura di controllare che la siringa si riempi completamente. Successivamente essi potranno essere sterilizzati in autoclave prima del lavaggio.

Utilizzo di altra piccola strumentazione.

Sonicatori e bagni ad ultrasuoni

L'aerosol può diffondere nell'ambiente anche senza la presenza visibile di schizzi come ad es. durante il trattamento di una sospensione con ultrasuoni.

Pertanto anche i sonicatori possono liberare aerosol. Devono essere quindi utilizzati in cappe di sicurezza biologica o coperti con schermi durante l'uso. Gli schermi e l'esterno dei sonicatori vanno decontaminati dopo l'uso.

I sonicatori possono inoltre provocare danni all'udito e dermatiti. Assicurarne l'isolamento ed indossare guanti per proteggersi dall'azione combinata sulla pelle delle alte frequenze e del detergente.

Tutte le operazioni devono essere effettuate in contenitori chiusi ermeticamente.

Preparazione di strisci.

Una volta effettuato uno striscio di materiale biologico, è necessario lasciar asciugare il vetrino all'aria per almeno 2 ore prima di passare alla fissazione al calore, che si effettua flambando il vetrino stesso per alcune volte sulla fiamma. Questo fa sì che non restino sul vetrino delle gocce macroscopiche di liquido che, durante il passaggio sulla fiamma, potrebbero evaporare rapidamente e diffondersi nell'aria.

Frigoriferi di tipo domestico.

I frigoriferi comunemente presenti nei laboratori contengono possibili fonti di scintille (termostati automatici, interruttori della luce, elementi di riscaldamento ecc.) che possono causare l'accensione dei vapori che si possono eventualmente accumulare in seguito alla conservazione di solventi infiammabili. Tutti i contenitori che vengono introdotti nel frigorifero devono essere a tenuta ermetica, possibilmente con tappo a vite; il loro contenuto deve essere chiaramente identificabile con l'uso di apposite etichette indelebili. È sconsigliato l'impiego di fogli di alluminio o di plastica per chiudere i contenitori.

Evitare assolutamente di conservare nello stesso frigorifero, fianco a fianco, campioni pericolosi ed alimenti e bevande che vengono consumati dal personale.

Affiggere sui frigoriferi di tipo domestico un cartello con il divieto di conservare all'interno i solventi infiammabili. Modificare i frigoriferi spostando i controlli manuali della temperatura all'esterno della carrozzeria, sigillare tutti i punti da cui passano i fili provenienti dall'interno. I frigoriferi con il controllo automatico dello sbrinamento non possono tuttavia subire questa modifica.

Bagnomaria e apparecchi Warburg.

L'acqua contenuta nelle vaschette termostate, nei bagnomaria e nei sistemi di raffreddamento può facilitare la proliferazione dei microrganismi con conseguente pericolo di contaminazione. È pertanto opportuno procedere all'aggiunta di sostanze che limitino la

moltiplicazione microbica. L'azide sodica, utilizzata comunemente per questi scopi, forma composti esplosivi a contatto con alcuni metalli. Al suo posto si possono utilizzare delle compresse di 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diolo (BNPD), che hanno un ampio spettro di attività microbica alla concentrazione di 50-400 ppm. Sarebbe comunque preferibile evitare l'uso di additivi chimici e sostituirlo con procedure di pulizia e disinfezione regolari e con la sostituzione frequente e periodica dell'acqua.

Stabulari

Pur non facendo parte delle attrezzature di laboratorio vere e proprie, in quanto sono strutture a sé stanti, gli stabulari saranno considerati in questa sede perché costituiscono una notevole fonte di rischio biologico per gli operatori, sia per le manovre che si effettuano durante la manipolazione degli animali, sia perché è stato dimostrato sperimentalmente che è possibile una contaminazione dell'ambiente da parte degli aerosol generati dagli animali infetti e dai loro prodotti di escrezione. Su questi rischi e sugli accorgimenti da adottare per limitarli esiste una vasta letteratura, cui si rimanda per una completa informazione. Sarà qui esposta una rapida rassegna dei concetti fondamentali di utilità pratica.

I principali rischi di contaminazione biologica che si riscontrano in uno stabulario sono imputabili prevalentemente a morsi e graffi che spesso si verificano per errori durante la manipolazione e il contenimento degli animali, e attraverso i quali possono essere trasmessi agenti biologici patogeni.

Gli animali possono trasmettere all'uomo circa 30 malattie (zoonosi); inoltre, per necessità sperimentali, gli animali stessi possono essere stati infettati artificialmente con altri agenti trasmissibili all'uomo.

Tra le zoonosi più frequenti si ritrovano quelle descritte qui di seguito.

- *Tinea corporis*. Si realizza per contatto cutaneo; tra le specie più frequentemente coinvolte vi sono il coniglio e il gatto. Gli animali presentano aree cutanee prive di pelo in diverse parti del corpo. Nell'uomo la *T. corporis* provoca lesioni cutanee a bersaglio, caratterizzate da prurito più o meno intenso. Oltre agli animali malati, sono contagiosi per l'uomo anche i soggetti asintomatici o guariti da poco, che possono ugualmente disseminare spore infettanti.
- *Scabbia/acariasi*. E' un'infezione meno frequente della precedente. Negli animali provoca la comparsa di lesioni pruriginose crostose e nell'uomo dermatite. E' possibile il contagio da conigli affetti da otite parassitaria.
- *Pasteurellosi*. Viene trasmessa da conigli e altri roditori attraverso morsi o graffi. L'agente infettante, che è presente normalmente nelle cavità nasali dell'animale, può diventare virulento per fattori stressanti. Nell'uomo può provocare ferite suppurate e, in casi gravi, setticemia.
- *Leptosirosi*. L'infezione si trasmette per contatto con urina infetta. I roditori infestanti fungono da serbatoio biologico pertanto sono importanti i piani di derattizzazione. Nell'uomo determina forme setticemiche con insufficienza renale ed epatica, spesso letali.
- *Salmonellosi*. La malattia si contrae per trasmissione oro-fecale e la sua sintomatologia è prevalentemente enterica.
- *Febbre da morso del ratto*. E' causata da *Streptobacillus moniliformis*, che è presente e asintomatico nel nasofaringe del ratto e nella cavia. Nell'uomo può causare linfadeniti gravi, fino alla suppurazione dei linfonodi.

La permanenza degli operatori negli stabulari ha determinato inoltre la comparsa di numerose forme cliniche di allergie ascrivibili al contatto ed alla manipolazione degli animali da laboratorio.

Studi recenti riferiscono che l'allergia come malattia professionale colpisce dall'11 al 44% del personale che opera negli stabulari e in misura minore gli sperimentatori che vi accedono

occasionalmente. Gli animali coinvolti sono prevalentemente ratto, topo, coniglio, cane, gatto. Gli allergeni responsabili sono costituiti da proteine della saliva, delle feci, del siero e da forfora del pelo.

Per ridurre i rischi connessi con la manipolazione degli animali è necessario impiegare animali sani o "germ free". Rischio maggiore deriva dal contatto e dalla manipolazione di animali convenzionali, cioè dotati di flora microbica naturale. Si raccomanda di acquistare animali solo da allevatori e fornitori fidati, dotati di certificazioni sanitarie, trasportati correttamente e stabulati in modo idoneo. E' inoltre consigliabile fare ricorso a quarantena e a controlli clinici sugli animali stessi per evidenziare i soggetti malati o portatori di agenti patogeni trasmissibili.

L'ambiente e l'attrezzatura dello stabulario devono essere concepiti tenendo conto sia del benessere degli animali che della salute dell'uomo.

I locali devono quindi essere ben aereati, condizionati termicamente e ben isolati dal resto del laboratorio. Pareti e pavimento devono avere superfici lisce e lavabili. Le gabbie per gli animali dovrebbero essere sistemate in rastrelliere preferibilmente metalliche e possibilmente mobili, per permettere una pulizia accurata e agevole ed una disinfezione adeguata. Anche le gabbie devono essere metalliche, per consentire la sterilizzazione in autoclave prima del lavaggio. Le dimensioni delle gabbie possono variare secondo la taglia e il numero degli animali che devono essere stabulati, ma la possibilità, ampiamente dimostrata, di infezioni crociate suggerisce l'opportunità della stabulazione singola per assicurare la validità dei risultati.

Attualmente sono disponibili gabbie con modelli chiusi, provvisti di sistemi di ventilazione e di filtrazione dell'aria prima della sua eliminazione all'esterno.

Queste gabbie sono state progettate per il mantenimento degli animali "germ-free". Per essi infatti il problema della contaminazione si presenta rovesciato ma è analogo: proteggere l'animale "germ-free" da eventuali contaminazioni ambientali. L'adozione di queste gabbie sarebbe auspicabile anche per la stabulazione di animali infettati con agenti altamente patogeni, o quando l'animale deve essere inoculato per via nasale. Con questo accorgimento, infatti si possono evitare sia le infezioni crociate che la contaminazione dell'aria ambiente.

L'inoculazione degli animali per via parenterale deve essere eseguita in cabine di sicurezza, oppure, in mancanza di queste, in un locale isolato. E' un'operazione che espone l'operatore a vari rischi e deve essere quindi eseguita con la massima attenzione e da personale esperto.

Gli animali devono essere alloggiati in contenitori in maniera idonea. Per l'inoculo devono essere utilizzati aghi con montaggio a tenuta; la siringa deve essere riempita con cura al fine di minimizzare la formazione di bolle e schiuma. Per espellere l'aria dalla siringa prima dell'inoculazione, l'ago dovrà essere inserito in un batuffolo di cotone imbevuto di alcol. La sede dell'inoculazione deve essere disinfettata con tintura di iodio o altri disinfettanti prima e dopo l'operazione. Nel corso di tutte queste fasi operative si deve aver cura di non contaminare le superfici circostanti.

L'inoculazione intranasale o per via orale richiede l'applicazione di sistemi di protezione ancora più rigidi. Gli aghi e le cannule devono essere smussati e, in mancanza di gabbie con i sistemi di ventilazione descritti, le gabbie comuni, prima di essere riposte nelle rastrelliere, devono essere lasciate in cabine di sicurezza per un tempo opportuno; infatti, l'animale inoculato per via nasale, in genere dopo essere stato anestetizzato, produce, respirando, un fine aerosol per oltre un'ora dopo l'anestesia.

Per l'operatore è indispensabile l'uso di vesti di protezione, di guanti lunghi e, nel caso d'inoculazione per via nasale o per aerosol, di maschere protettive.

L'autopsia degli animali sacrificati, o morti in seguito all'infezione sperimentale, richiede l'applicazione di varie misure di sicurezza. Tutte le autopsie devono essere eseguite in cabina di sicurezza, da tecnici qualificati. L'animale deve essere ancorato su un vassoio metallico sterilizzabile e il pelo deve essere disinfettato con un disinfettante fenolico. Le incisioni devono essere praticate con la massima attenzione ed avere una lunghezza limitata, per evitare la disseminazione di particelle infette. Sarebbe opportuno conoscere il tempo massimo di sopravvivenza dell'agente infettante sul pelo e sugli orifizi naturali dell'animale.

Al termine delle operazioni, il piano di lavoro e le mani dell'operatore dovranno essere lavati e disinfettati accuratamente. Gabbie, vassoi, strumenti e abiti di protezione dovranno essere depositi in appositi contenitori e sterilizzati in autoclave prima del loro lavaggio. Le carcasse degli animali, le garze, i guanti monouso e gli aghi utilizzati devono essere chiusi in buste impermeabili ed inviati ad un inceneritore.

Contenimento del rischio di contaminazione biologica

Attrezzature e tecniche utilizzate per eliminare o ridurre i rischi

Essendo gli aerosol importanti fonti d'infezione, si deve cercare di ridurre la loro formazione e la loro dispersione al minimo possibile. Aerosol pericolosi possono essere generati, come abbiamo visto, da molte attività di laboratorio, quali la miscelazione, l'agitazione e lo scuotimento e la centrifugazione di materiali infetti. Persino quando si usano attrezzature di sicurezza, quando possibile, è meglio svolgere tutte le attività sotto una cappa di sicurezza biologica di tipo idoneo ed approvato.

L'uso delle attrezzature di sicurezza garantisce protezione solo se l'operatore è stato addestrato al loro uso e impiega tecniche appropriate. Le attrezzature vanno sottoposte regolarmente a test per garantirne il funzionamento.

Cappe a flusso laminare

Il controllo della contaminazione dell'aria è fondamentale in molti ambienti di lavoro, per tutelare la salute degli operatori e per assicurare al materiale manipolato le migliori condizioni di trattamento.

Fin dall'inizio, le tecniche batteriologiche si sono sviluppate mirando soprattutto alla protezione delle colture e non a quella dell'operatore che, nonostante l'osservazione scrupolosa delle norme corrette di lavoro, risultava esposto agli aerosol, che rappresentano rischio quasi inevitabile per chiunque svolga attività nel settore della microbiologia.

Già in passato si erano progettati e realizzati box o cabine in muratura (o metallo) e vetro, all'interno delle quali l'operatore, opportunamente protetto da vesti, guanti, ed eventualmente maschere, era abbastanza al riparo dal rischio della contaminazione. Con questo metodo la diffusione degli aerosol era relativamente contenuta all'interno del box.

Nel 1962 si affermò il concetto di flusso d'aria unidirezionale ed uniforme, o flusso laminare, la cui applicazione più diffusa è rappresentata dalle moderne cappe dette appunto "a flusso laminare".

La circolazione del flusso laminare avviene lungo direttrici parallele e mantiene l'aria che circola all'interno della cappa separata dall'ambiente esterno. Essa può venire purificata per filtrazione in entrata o in uscita in base alle esigenze richieste.

I filtri a carbone attivo vengono utilizzati per rimuovere gas o vapori nocivi, ma non sono in grado di rimuovere il particolato, inclusi i microrganismi. A questo scopo si utilizza un altro tipo di filtri che permettono la sterilizzazione dell'aria, definiti filtri HEPA.

I primi sono costituiti da carbone ottenuto dalle noci di cocco e attivato con trattamento al vapore ad alta temperatura. I filtri a carbone presentano una struttura porosa, con milioni di canalicoli di dimensioni molecolari, che aumentano enormemente la superficie di scambio. Si può arrivare ad oltre 2000m² per ogni grammo di carbone attivo. Il passaggio dell'aria nei filtri permette di adsorbire e neutralizzare i contaminanti chimici. Per impedimento sterico o per legami deboli il filtro può intrappolare le molecole complesse e pesanti dei vapori organici, gli idrocarburi alifatici e aromatici e le molecole inorganiche maggiormente polari come aldeidi e chetoni (adsorbimento). Trattamenti chimici particolari consentono al carbone attivo di trattenere anche molecole leggere e lineari (chemisorzione o chemioadsorbimento).

I filtri HEPA, invece, sono costituiti da sottili fogli di microfibre di vetro borosilicato, ripiegati più volte al fine di aumentare la superficie totale di filtrazione, posti su separatori d'alluminio ondulato e montati a tenuta perfetta su una struttura portante.

Per essere utilizzati nelle cabine di sicurezza, essi devono rispondere a particolari requisiti che ne stabiliscono l'efficienza, ed essere dichiarati appartenenti alla classe dei filtri assoluti o HEPA (High Efficiency Particulate Air).

A seconda della qualità, il filtro HEPA è in grado di trattenere un numero di particelle di diametro 0,3 micron, che varia da 9.997 a 9.999 su un totale di 10.000.

In aggiunta ai filtri, spesso si utilizzano dei prefiltri che hanno lo scopo di trattenere le particelle grossolane di pulviscolo. Essi sono costituiti da un "tessuto non tessuto" di fibre polimeriche, dotate di carica elettrostatica ed in grado di sviluppare un'elevata efficienza di filtrazione. I prefiltri hanno lo scopo di evitare un invecchiamento precoce dei filtri per intasamento, e devono essere sostituiti ad intervalli regolari affinché si mantenga costante la velocità di flusso dell'aria.

Il flusso laminare si ottiene dalla combinazione di un filtro HEPA con una massa d'aria che lo attraversa alla velocità costante di 0,45 m/s, +/- 20% (moto laminare del flusso).

Lo spostamento dell'aria è realizzato da motoventilatori collocati prima dei filtri: la velocità del flusso, che deve essere costante, viene controllata con l'uso di anemometri ed è regolabile mediante variazione della tensione dei motoventilatori. Questo permette di ovviare all'inevitabile progressivo intasamento dei filtri da cui deriverebbe, altrimenti, una diminuzione della velocità del flusso.

Per il controllo della qualità dell'aria emergente si utilizzano sistemi di misurazione a luce diffusa (fotometri).

In funzione del numero di particelle presenti, le Norme previste dal Federal Standard 209 rev.e. (USA) definiscono sei classi di contaminazione (da 1 a 100.000). La Classe 100 è la più importante da un punto di vista biologico. L'aria emergente è definita "pura di classe 100" quando garantisce una presenza di particelle di dimensioni $\geq 0,5 \mu\text{m}$ superiore a 100 unità/piede³ d'aria (circa 28 litri). Essa equivale alla classe 3,5 M espressa in unità metriche, (3530 particelle per m³ d'aria) secondo la definizione seguente: classe Metrica = \log_{10} (numero massimo di particelle ammesse dalle Federal Standard 209 rev.e)/m³.

A seconda della direzione del flusso laminare, l'aria generata dal filtro può muoversi parallelamente al piano di lavoro, spingendo verso l'esterno le particelle di aerosol (flusso laminare orizzontale), oppure può scorrere perpendicolarmente ad esso, verso altri filtri che la trattengono (flusso laminare verticale).

Classificazione delle cappe a flusso

Con il progredire delle ricerche e delle applicazioni nei vari settori delle bioscienze è proporzionalmente aumentata la richiesta di equipaggiamenti atti a prevenire le contaminazioni accidentali dei prodotti, del personale e dell'ambiente.

Le cappe a flusso rappresentano la soluzione più efficace per questo tipo di problematiche. Esse possono rispondere a vari gradi di protezione:

- 1) Protezione del materiale manipolato all'interno della cappa dai contaminanti presenti nell'ambiente e dalla contaminazione crociata all'interno della cappa stessa.
- 2) Protezione del personale da agenti dannosi presenti all'interno della cappa.
- 3) Protezione dell'ambiente dai contaminanti presenti nella cappa.

Protezione del materiale manipolato

Cappe a flusso laminare orizzontale

Le cappe a flusso laminare orizzontale garantiscono la protezione del materiale manipolato dalla contaminazione da particelle inerti o viventi presenti nell'aria.

Il motoventilatore collocato nella parete posteriore della cabina genera un flusso orizzontale di aria sterile a velocità costante ed uniforme. La massa d'aria viene filtrata da un prefiltro e quindi da un filtro HEPA che occupa la sezione principale dell'area di lavoro. Quindi il flusso investe il fronte anteriore della cabina e si comporta come un pistone allontanando all'esterno le particelle di aerosol e assicurando un'assoluta protezione delle operazioni che si effettuano nel vano della cabina. L'unità riprende l'aria dall'ambiente attraverso il prefiltro che ha il compito di estendere la durata del filtro HEPA.

Queste cabine non proteggono l'operatore; pertanto il loro impiego è rivolto prevalentemente ad applicazioni industriali come lavorazioni ottiche, manipolazioni di componenti di microelettronica e micromeccanica; in un laboratorio biologico l'uso di queste cappe è limitato alla preparazione di soluzioni, alla manipolazione di materiale sterile e di materiale biologico non patogeno.

Le cappe a flusso laminare orizzontale (cappe sterili), non sono cappe di sicurezza biologica e non vanno usate come tali. Fig 4.

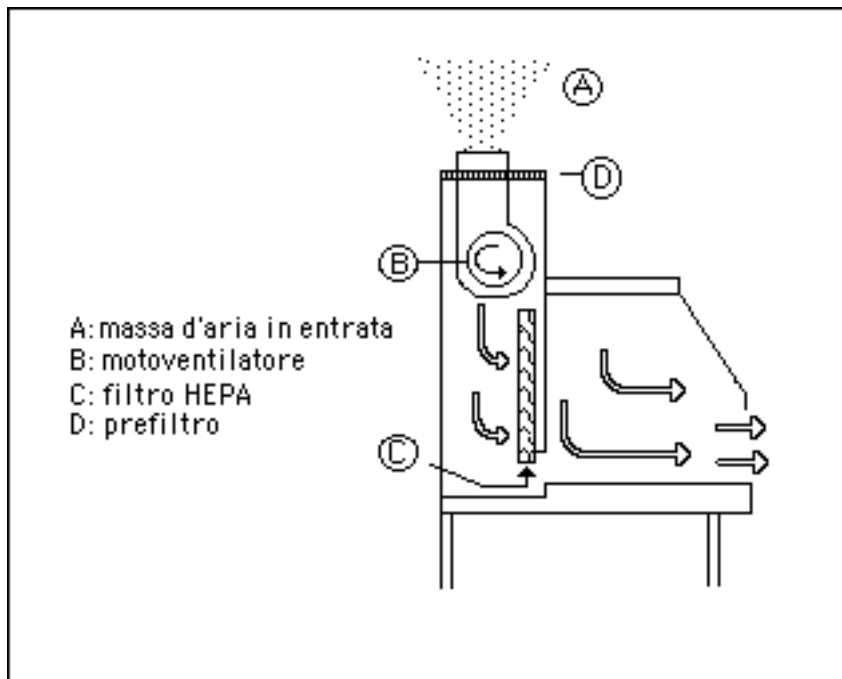


Fig. 4: Cappa a flusso laminare orizzontale (veduta in sezione laterale).

L'aria in entrata (A), aspirata dal motoventilatore (B), passa attraverso il prefiltro (D), attraverso il filtro HEPA (C) ed entra nel vano della cabina; quindi si dirige verso l'apertura frontale e allontana i contaminanti all'esterno.

Protezione dell'ambiente e dell'operatore:

Cappe a flusso laminare verticale

Qualora vi sia l'esigenza di proteggere anche l'operatore e l'ambiente, occorre utilizzare delle cappe a flusso laminare verticale a parziale ricircolo dell'aria (cappe biologiche).

Le norme previste dal National Federal Standard 49 (USA) definiscono tre classi (classe I, II e III), di cappe di sicurezza biologica, alle quali corrispondono differenti strutture e schemi di funzionamento in grado di offrire diversi livelli di sicurezza.

Cappe biologiche di classe I

Sono cappe ventilate, aperte frontalmente, progettate per tutelare l'ambiente e l'operatore dai contaminanti presenti nella cabina.

La protezione dell'ambiente è garantita dalla presenza di un filtro HEPA che, filtrando l'aria in uscita, impedisce la contaminazione dell'ambiente esterno.

La protezione dell'operatore è resa possibile dal costante flusso d'aria diretto dall'esterno all'interno della cabina attraverso l'apertura frontale.

La protezione del materiale manipolato da contaminazioni esterne non è possibile perché l'aria in entrata non è filtrata (fig 5). Le cappe biologiche di classe I possono essere usate impiegate per manipolazioni di agenti a basso rischio biologico.

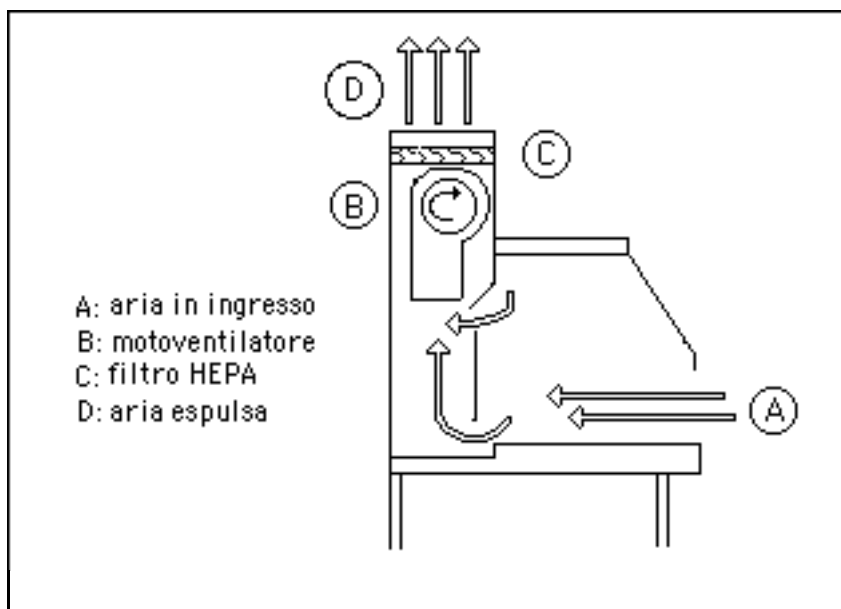


Fig.5: Cappa flusso laminare di classe I (veduta in sezione laterale).

La massa d'aria aspirata crea un flusso laminare nel vano di lavoro. Questa massa d'aria viene ricircolata e parzialmente espulsa dal motoventilatore (B) passando attraverso un filtro HEPA (A). L'aria espulsa viene bilanciata da una pari quantità d'aria esterna (C) che crea una barriera frontale d'isolamento nella zona frontale di accesso all'area di lavoro.

Protezione del materiale, dell'operatore e dell'ambiente

Cappe di sicurezza biologica di classe II

Diversamente dalle cappe di classe I, quelle di classe II, sono progettate per la contemporanea protezione dell'operatore, dei prodotti manipolati al suo interno e dell'ambiente circostante. Pertanto sono ampiamente utilizzate nei laboratori di ricerca, in quelli di analisi microbiologiche, negli ospedali ecc.

Sono provviste di un'apertura frontale che permette l'ingresso dell'aria e sono caratterizzate dalla filtrazione sia dell'aria aspirata che di quella espulsa.

Le cappe di classe II, vengono suddivise in quattro categorie:

Cappe di classe II tipo A (cappe BioHazard)

Cappe di classe II tipo B1

Cappe di classe II tipo B2

Cappe di classe II tipo B3

Il flusso laminare verticale e l'apertura frontale sono comuni a tutte le cappe di classe II. Lo schema del flusso, la posizione dei filtri, la velocità di ventilazione e il rapporto tra aria riciclata e aria scaricata, nonché le modalità di espulsione all'esterno variano nei diversi tipi di cappe di classe II.

Cappe di classe IIA ovvero le cappe Biohazard

Le cappe di classe II tipo A sono denominate Biohazard dalla normativa del National Federal Standard 49 (USA). Esse possiedono caratteristiche costruttive e parametri di funzionamento regolamentati da Standard internazionali: DIN (Deutsches Institut für Normung) 12950 (Germania); BS (British standards Institution) 5726 (Regno Unito); AFNOR (Francia); NFS 209/E USA); 2252 Australian standard (AU) e altre ancora.

La norma EN 12469 è lo standard europeo che definisce e unifica le Cappe Biohazard.

Esse trovano impiego nei laboratori di microbiologia, virologia e batteriologia in particolare per la manipolazione di agenti biologici considerati di basso/moderato rischio, come gli agenti biologici di livello 2 e 3 (626/94). In queste cappe il 70% dell'aria viene fatta ricircolare all'interno della cabina mentre il 30% viene espulsa con velocità di barriera 0,4 m/s) (fig 6)

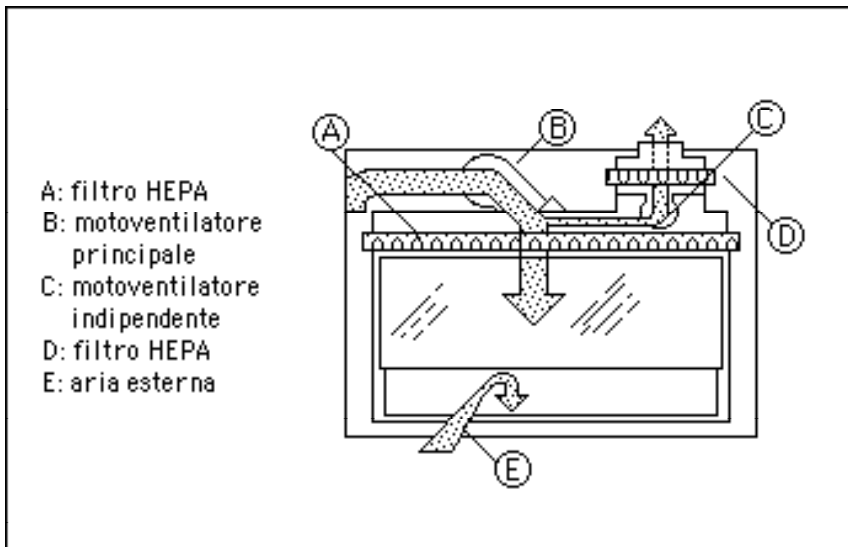


Fig: 6 Cappa di classe II Biohazard (veduta frontale).

L'aria che attraversa il filtro HEPA (A) crea un flusso laminare nel vano di lavoro. Quest'aria è aspirata, ricircolata e parzialmente espulsa attraverso l'apertura frontale. Un motoreventilatore indipendente (C) espelle attraverso un secondo filtro HEPA (D) il 30% dell'aria. L'espulsione viene bilanciata da una pari quantità di aria esterna che crea la barriera frontale di protezione tra operatore e zona di lavoro (E)

Cappe di classe II tipo B1

In queste cappe il 30% dell'aria viene ricircolata all'interno mentre il 70% viene scaricato direttamente dalla superficie di lavoro tramite un condotto posto sul retro della cappa. Questo tipo di cappa non è utilizzato in Europa.

Cappe di classe II tipo B2

Non prevedono il riciclo dell'aria: essa è continuamente espulsa direttamente dall'area di lavoro. Questo tipo di cappa non è utilizzato in Europa.

Cappe di classe II tipo B3

E' un particolare tipo di cappa BIOHAZARD, costruita in conformità con le norme DIN 12980 (Germania), e approvata dall'OMS.

Rispetto alle classiche Biohazard (classe II tipo A), le cabine Classe II B3 si differenziano per la velocità della barriera frontale che costituisce un isolamento tra operatore e prodotto manipolato. Dai normali 0,4 m/s previsti per la sottoclassificazione che le identifica di tipo A, si passa ad una velocità di 0,51 m/s. il rapporto tra aria riciclata e aria espulsa rimane, invece, il medesimo con il 70% di aria in ricircolo. Il 30% residuo è espulso e all'esterno per canalizzazione. Le differenze sostanziali riguardano il sistema di filtrazione.

Una filtrazione meccanica viene fatta in mandata attraverso i filtri HEPA ma sotto il piano di lavoro è presente un ulteriore sistema di filtraggio (costituito da n.2 filtri HEPA di notevole spessore e assemblati in serie) affinché si possa considerare sterile anche l'aria che si appresta a fuoriuscire e che è comunque presente all'interno della cappa durante l'ordinario funzionamento. Queste cappe trovano impiego nelle farmacie ospedaliere come mezzo di protezione ambientale fondamentale per

la manipolazione e la preparazione di farmaci antitumorali che, secondo quanto prescritto dalla legge 626/94 e dall'OMS, deve avvenire all'interno di un laboratorio dedicato.

I carboni attivi, situati immediatamente a valle del doppio filtro HEPA provvedono alla neutralizzazione della tossicità di eventuali vapori o gas oggetto di lavorazione (fig 7).

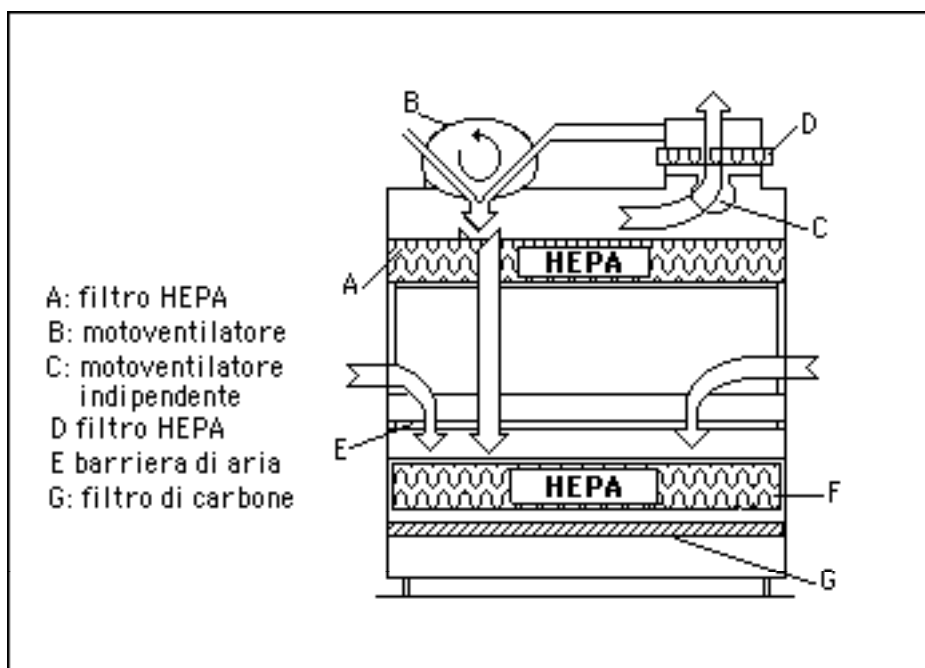


Fig. 7 Cappa di classe II B3 (veduta frontale).

L'aria che attraversa il filtro HEPA (A) crea un flusso laminare nel vano di lavoro. Essa è aspirata e ricircolata dal motoventilatore principale (B). Un ventilatore indipendente (C) espelle il 30% dell'aria attraverso un secondo filtro HEPA (D). L'espulsione è bilanciata da una pari quantità di aria esterna che crea la barriera frontale di protezione tra l'operatore e la zona di lavoro (E). L'aria aspirata dall'esterno, insieme a quella proveniente dalla zona di lavoro, attraversa un filtro HEPA (F) e un filtro a carbone attivo (G) posti sotto il piano di lavoro prima di raggiungere il motoventilatore principale.

Cappe biologiche di classe III

Si tratta di cappe ventilate, sigillate ermeticamente, a tenuta d'aria, e mantenute a pressione negativa; sono caratterizzate dalla filtrazione assoluta, mediante un filtro HEPA, dell'aria in entrata e dalla filtrazione assoluta, mediante due filtri HEPA posti in serie, dell'aria in uscita, che viene espulsa totalmente (ricircolo zero).

L'accesso all'interno avviene attraverso guanti di gomma a tenuta alla parete della cappa che realizzano la protezione assoluta dell'operatore e dei materiali trattati ma presentano l'inconveniente della ristrettezza dell'accesso al piano di lavoro che rende le operazioni più scomode e indagginose.

Le cappe di classe III possono essere dotate di vaschetta per la disinfezione dei contenitori che entrano o escono dallo spazio di lavoro. Spesso sono collegate in linea tramite portelli a tenuta. In fondo può anche essere compresa una autoclave. Esse sono indicate quando si lavora con agenti

ad alto rischio biologico. Poiché esse garantiscono un alto livello di protezione vengono utilizzate quando è richiesto un totale contenimento di sostanze altamente infettive o pericolose ed in particolare nella manipolazione di microrganismi ad alto rischio (gruppo di rischio 4). Fig. 8

Nelle cappe di classe III non vanno usati gas infiammabili

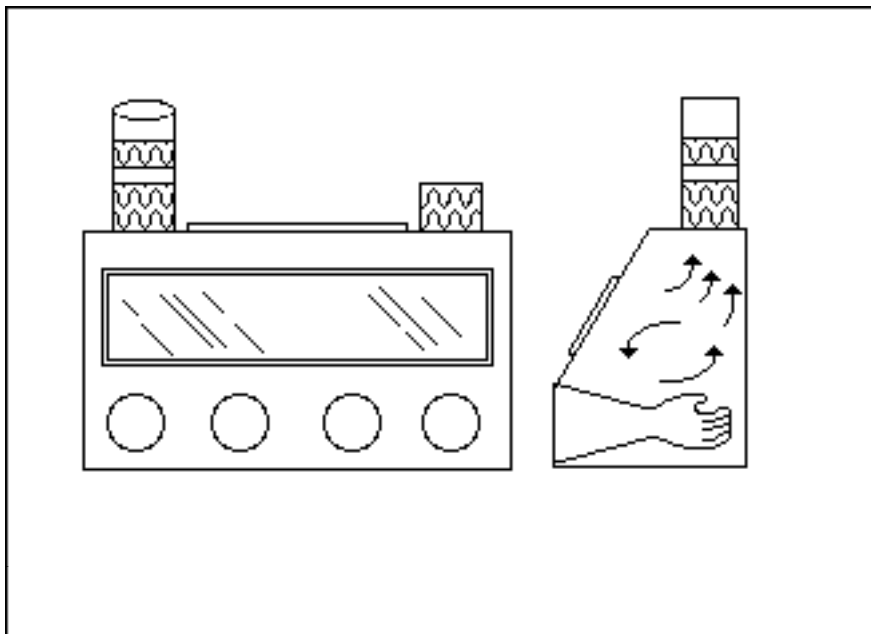


Fig. 8. Cappa di classe III (veduta frontale [a] e sezione laterale [b]).

L'aria è filtrata sia in entrata che in uscita. L'aria in entrata passa attraverso un filtro HEPA, mentre quella in uscita passa attraverso due filtri HEPA posti in serie. L'aria che circola nella cappa è espulsa totalmente (ricircolo zero).

Accorgimenti e manutenzione

Le cabine di sicurezza sono fornite di lampade a raggi ultravioletti che trovano in queste attrezzature uno dei loro più efficaci impieghi per la decontaminazione di aria e superfici.

Prima di iniziare il lavoro, dopo aver sistemato i materiali e le colture sul piano di lavoro, è opportuno ventilare la cappa per circa 30 minuti a cabina chiusa e con lampada a raggi ultravioletti accesi.

La strumentazione e il materiale presente all'interno della cappa devono essere ridotti al minimo, posizionati nella parte posteriore dell'area di lavoro ed essere visibili attraverso la protezione in vetro. Non si devono impiegare lampade a gas tipo Bunsen all'interno della cabina, in quanto il calore prodotto può distorcere il flusso d'aria e può danneggiare i filtri. E' consigliabile adottare becchi Bunsen con accensione elettronica o impiegare materiale sterile monouso. Tutta l'attività manuale si deve concentrare nella parte media e posteriore della superficie di lavoro; il pannello protettivo non deve essere completamente sollevato. Il passaggio di persone alle spalle dell'operatore dovrebbe essere ridotto al minimo. L'operatore non deve disturbare il flusso d'aria con movimenti ripetuti e reintroduzioni delle braccia. Gli aspiratori della cabina devono essere lasciati funzionare regolarmente per diversi minuti al termine di ogni ciclo di lavoro.

La disinfezione di tutto il complesso delle cabine (filtri compresi), deve essere effettuata vaporizzando soluzioni acquose di formaldeide o di glutaraldeide. Entrambe le soluzioni sono efficaci purché si mantenga l'umidità relativa intorno al 75%. La glutaraldeide sarebbe da preferire

per la minore tendenza a polverizzare sulle superfici: per ogni piede cubico di spazio ($0,28\text{m}^3$) è sufficiente far agire localmente 30 ml di glutaraldeide al 10%.

E' indispensabile un'accurata manutenzione periodica delle cabine che comprenda il controllo del livello del flusso d'aria, dell'efficienza dei filtri e, per le cabine chiuse, il controllo della pressione differenziale e, infine, il controllo dell'efficienza delle lampade a raggi ultravioletti.

E' importante che il flusso laminare d'aria mantenga la sua uniformità fino al piano di lavoro, che dovrà essere perforato in modo regolare ed esteso per permettere la ripresa dell'aria. La velocità del flusso è un fattore critico, in quanto un flusso troppo rapido potrebbe creare turbolenza nella zona di lavoro, trasportando aria dall'esterno all'interno, mentre un flusso scarso consentirebbe ad eventuali particelle di fuoriuscire dalla cabina. Gli stessi principi utilizzati nelle cabine a flusso laminare per l'esecuzione delle varie tecniche batteriologiche devono essere applicati alla costruzione di box per la sistemazione di centrifughe, agitatori o altri apparecchi generatori di aerosol.

Distruzione degli agenti contaminanti

Sterilizzazione

La sterilizzazione è la procedura più efficace per la uccisione dei germi. Durante la sterilizzazione vengono distrutti tutti gli agenti biologici, sia quelli patogeni che quelli non patogeni nonché le spore più resistenti.

Sterilizzazione con il calore

Il calore agisce alterando le molecole che costituiscono le strutture dei microrganismi; particolarmente sensibili all'azione del calore sono le proteine con funzioni enzimatiche. Le varie specie microbiche presentano diversa resistenza al calore: i virus (esclusi quelli dell'epatite), i batteri in forma vegetativa, i miceti ed i protozoi sono, in genere, molto sensibili al calore; molto più resistenti sono le spore, specialmente quelle prodotte da batteri che hanno come habitat l'ambiente esterno e quelle prodotte da specie termofile (es. *Clostridium botulinum*, *Bacillus stearothermophilus*).

Per la sterilizzazione può essere utilizzato sia il calore secco che il calore umido.

Il calore secco può essere ottenuto da una fiamma viva, come nel flambaggio di superfici ed oggetti (es. anse da batteriologia) o nell'incenerimento degli oggetti contaminati che si vogliono distruggere, oppure da generatori di aria calda o di radiazioni infrarosse.

Il calore umido viene di regola utilizzato come vapore saturo sotto pressione in quanto il vapore fluente e l'acqua bollente non sono adatti come mezzi di sterilizzazione, poiché non garantiscono una sterilizzazione efficace. La temperatura di ebollizione dell'acqua, infatti, è di 100°C (o meno a seconda dell'altitudine), ma le spore dei bacilli termoresistenti sopravvivono per parecchie ore a questa temperatura.

Sterilizzazione al calore secco

Per la sterilizzazione con aria calda s'impiegano appositi armadietti, le stufe a secco; essi sono dotati di una doppia parete separata da una intercapedine al cui interno è presente dell'acqua e nel loro interno si possono raggiungere temperature fino a 200°C .

Il calore secco possiede scarsa capacità di penetrazione; pertanto, per uccidere le spore termoresistenti è necessario raggiungere temperature elevate e farle agire per tempi abbastanza lunghi; le condizioni più efficaci si realizzano facendo raggiungere al materiale da sterilizzare una temperatura di 180°C almeno per 30 minuti.

Sterilizzazione al calore umido

I microrganismi sono più sensibili al calore che si sviluppa in ambiente umido; ciò è dovuto alla maggiore conducibilità termica ed alla notevole capacità di penetrazione dell'acqua e del vapore rispetto all'aria. E' per questo motivo che, con il calore umido, si può ottenere la distruzione delle spore a temperature e tempi inferiori rispetto a quelli necessari per il calore secco. Il vapore acqueo sotto pressione è il più efficace metodo per sterilizzare materiali di laboratorio. Perché la sterilizzazione sia garantita, è necessario che il vapore sia saturo; infatti, il tempo di uccisione dei microrganismi si allunga in proporzione al contenuto di aria nel vapore.

Per l'uccisione con il calore umido delle spore dei bacilli patogeni (es. il bacillo tetanico, o il clostridium della gangrena gassosa) e dei bacilli ambientali mesofili è sufficiente la temperatura di 121° C per poco più di 10 minuti.

Poiché a livello del mare l'acqua raggiunge l'ebollizione alla temperatura di 100°C, è necessario aumentare la pressione di una atmosfera affinché la temperatura del vapore s'innalzi fino a 121°C. Ciò si ottiene facendo bollire l'acqua in una autoclave, cioè in una caldaia a chiusura ermetica in cui il vapore che si accumula fa progressivamente innalzare la pressione (vapore saturo sotto pressione).

Le autoclavi.

Le norme europee in tema di recipienti a pressione richiedono che la progettazione e la costruzione delle autoclavi sia soggetta ad approvazione in accordo a normative ufficiali internazionali, che in Italia sono controllate dall'Ispe.

L'autoclave deve essere dotata di un sistema di fusibili esterno allo strumento che permetta di togliere la corrente in caso di corto circuito. Deve essere fornita di un sistema di sicurezza che le impedisca di entrare in funzione se il coperchio non è chiuso ermeticamente e che ne blocchi l'apertura sino a quando esista pressione all'interno della camera di sterilizzazione.

La pressione in camera di sterilizzazione deve tornare immediatamente a zero in caso di maldestro tentativo di apertura. Il coperchio deve essere protetto da materiale isolante per evitare possibili ustioni dell'operatore.

L'autoclave deve essere inoltre dotata di un pannello di comando fornito di un indicatore luminoso del ciclo di sterilizzazione che mostri in modo inequivocabile la fase del ciclo operativo, al fine di prevenire errori di manovra. L'uscita del vapore dalla valvola di scarico automatico deve essere convogliata in contenitori di raccolta protetti; inoltre il getto di vapore deve essere direzionato in modo da non rischiare di colpire l'operatore. La caldaia deve essere coibentata per ridurre i rischi di scottature.

Tre sono i tipi di autoclave utilizzati più comunemente: quelli a gravità, quelli a vuoto, e le pentole a pressione riscaldate a combustibile.

Autoclavi a gravità

Dopo che l'autoclave è stata caricata e il portello chiuso, il vapore viene inviato alla camera tramite una linea di rifornimento (ad es. da una centrale termica) passando attraverso una valvola che ne riduce la pressione.

Un deflettore dirige il vapore verso la parte superiore della camera spingendo l'aria, che ha una densità maggiore, verso il basso dove essa viene catturata da una trappola situata a valle di un filtro che trattiene le impurità. Quando la temperatura si abbassa di circa 2°C rispetto della temperatura del vapore saturo, la trappola si apre, per permettere la fuoriuscita di aria, vapore e miscele condensate, e si richiude per consentire al sistema di ripristinare l'aumento della pressione e della temperatura.

Questo fa sì che all'interno della camera resti solo vapore saturo. Quando si raggiunge la temperatura 121°C, che è quella necessaria per una sterilizzazione adeguata, la valvola di ingresso del vapore si chiude e il ciclo va avanti per 30 min. Il tempo di mantenimento della temperatura è detto Holding Time At Temperature (HTAT).

Autoclavi sotto vuoto.

L'aria presente nel carico da sterilizzare è rimossa tramite una pompa da vuoto; il vapore all'interno della camera si produce e si espelle ad intermittenza per assicurare una rapida penetrazione del materiale. L'aria eliminata può contenere aerosol infetti e, pertanto, non deve fuoriuscire direttamente nell'ambiente ma essere evacuata passando attraverso un sistema chiuso e dotato di filtri. Alla fine del ciclo, il vapore è espulso automaticamente e il carico raffreddato con getti o iniezioni di acqua. Le autoclavi sotto vuoto possono raggiungere anche i 134°C; a questa temperatura la durata del ciclo può essere ridotta a 5'. Fig. 9

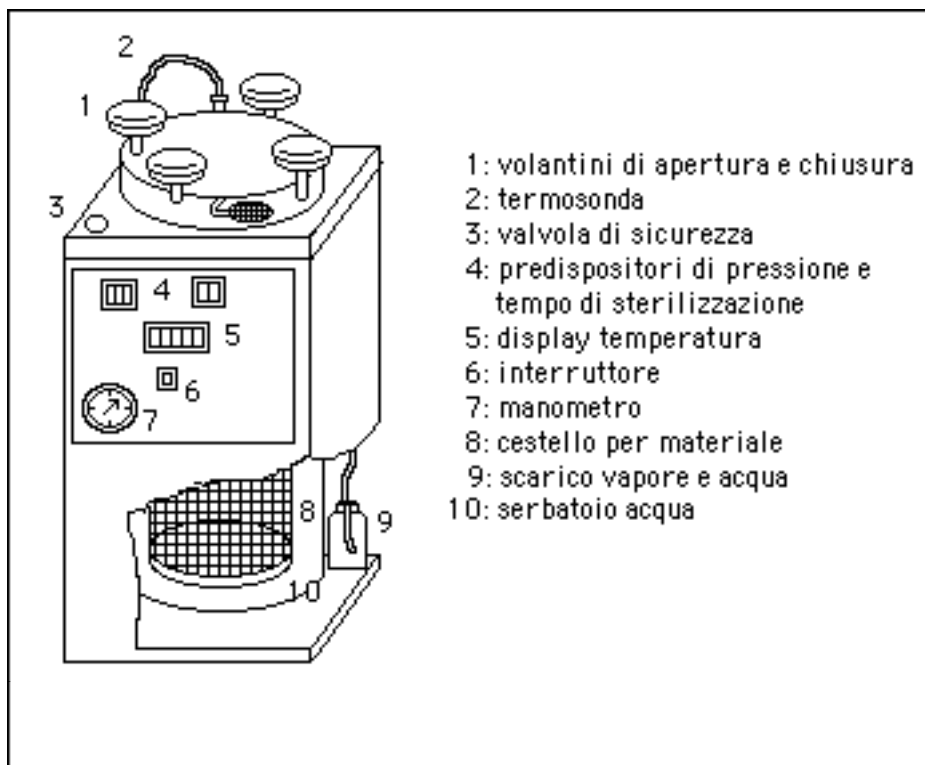


Fig. 9. Rappresentazione schematica di una autoclave a pressione.

Pentole riscaldate a combustibile.

Andrebbero usate solo se non è disponibile un'autoclave a gravità. Esse devono essere caricate dall'alto e riscaldate a gas o elettricamente. Il vapore è generato dal riscaldamento dell'acqua situata alla base del contenitore mentre l'aria viene espulsa da una valvola di scarico. Dopo la completa espulsione dell'aria la valvola si chiude e la temperatura si abbassa. La pressione e la temperatura salgono finché si raggiunge un valore prestabilito al quale è sensibile la valvola di sicurezza.

A questo punto inizia la sterilizzazione con il mantenimento di temperatura e pressione per un tempo prestabilito. Alla fine del ciclo viene spenta la fonte di calore e si lascia abbassare la temperatura prima di aprire il coperchio.

I materiali e gli oggetti da sterilizzare non devono essere accatastati strettamente nella camera, ma devono essere disposti in modo da permettere la completa rimozione dell'aria. Questo assicura la libera circolazione del vapore e consente la sterilizzazione di tutto il carico. Le buste di plastica vanno introdotte aperte, altrimenti il vapore non può penetrare al loro interno. Tutti i materiali vanno posti in contenitori piccoli e poco profondi. Il filtro per lo scarico dei liquidi, situato sul fondo della camera, va rimosso e pulito quotidianamente.

I materiali che si sospetta contengano agenti non convenzionali o prioni (ad es. agenti della malattia di Creutzfeldt-Jacob, dello scrapie o della encefalopatia spongiforme bovina) richiedono temperature elevate e/o tempi più lunghi per essere inattivati: ad esempio 134°C con un HTAT di 18' o sei cicli separati di 134°C con un HTAT di 3' per ciclo.

In un laboratorio di microbiologia sarebbe opportuno l'utilizzo di autoclavi a doppia porta, installate all'interno di un corridoio che divida due locali: attraverso la porta che corrisponde alla zona infetta del laboratorio o dello stabulario si può introdurre il materiale da sterilizzare; attraverso l'altra porta, che corrisponde alla zona di preparazione del materiale sterile, si estrae il materiale sterilizzato che deve essere successivamente trattato oppure eliminato.

Non bisogna mai sterilizzare prodotti chimici o sali in quanto può verificarsi il rischio di esplosione o corrosione. La temperatura dei liquidi sterilizzati scende molto più lentamente di quella della camera. Pertanto si raccomanda di aprire l'autoclave solo quando la temperatura è scesa al di sotto dei 60°C.

Occorre sottolineare che anche l'uso dell'autoclave può provocare la produzione di aerosol, e quindi il rischio di liberazione di vapori infetti.

La fase iniziale della sterilizzazione in autoclave determina la fuoriuscita di aria potenzialmente contaminata. Quindi i vapori che si formano all'interno della camera dovrebbero essere opportunamente filtrati e poi eliminati all'esterno attraverso un sistema chiuso di tubazioni. La nuova generazione di autoclavi è dotata di sistemi di condensa dello spurgo del vapore per evitare il diffondersi all'aperto dell'aerosol.

Tutte le operazioni eseguite dall'autoclave dovrebbero essere sotto un controllo automatico; questo dovrebbe monitorare tutte le fasi della sterilizzazione ed indicare le condizioni di "sicurezza" solo quando è stato completato il ciclo alla temperatura richiesta.

Controllo della sterilizzazione al calore

Sia le stufe a secco che le autoclavi dovrebbero essere collaudate al momento dell'installazione per controllare la loro efficienza e per stabilire la durata dei tempi di sterilizzazione in rapporto ai materiali da trattare.

La correttezza dei cicli di sterilizzazione deve essere controllata sistematicamente mediante gli strumenti di misurazione posti in ciascun apparecchio come termometri, manometri, e misuratori di livello dell'acqua. Per controllare che la temperatura richiesta sia raggiunta in ogni punto dell'autoclave si consiglia di porre degli indicatori di sterilità biologica al centro di ogni carico. Si possono disporre, in mezzo al materiale da sterilizzare, delle fialette contenenti sostanze che fondono o cambiano colore a determinate temperature. Un controllo più idoneo a rilevare l'efficacia della sterilizzazione consiste nell'introduzione di confezioni di spore batteriche termoresistenti: se le spore, seminate in un terreno di coltura idoneo dopo il completamento del ciclo, non danno origine a colonie di crescita batterica si può affermare che la sterilizzazione è avvenuta in modo corretto. Un'ulteriore modalità di controllo dell'efficacia di sterilizzazione è costituita dall'uso di opportuni nastri adesivi in carta che sulla superficie non adesiva presentano spore termosensibili disposte in disegni geometrici. A sterilizzazione avvenuta le spore si colorano di marrone ed i disegni risultano visibili.

Prima di essere sterilizzati in autoclave, tutti gli oggetti devono essere ben puliti. Si raccomanda di procedere ad un prolungato risciacquo degli oggetti stessi con acqua distillata, per evitare che sostanze contaminanti rimangano sulla superficie della strumentazione e della vetreria da sterilizzare. Alcuni materiali plastici non possono essere sterilizzati in autoclave. Il polipropilene, il poli metil propilene, il poli allomero ed il teflon possono essere sottoposti a ripetuti trattamenti di sterilizzazione a 121°C per 15 minuti. Il policarbonato invece presenta diminuzione della resistenza meccanica dopo trattamenti ripetuti, così come il polisulfone. Il polistirolo, il cloruro di vinile, il nylon, lo stirolo acrilonitrile e il polietilene non sono sterilizzabili in autoclave. Tutte le plastiche sopramenzionate possono essere sterilizzate con gas (ossido di etilene o formaldeide).

Sterilizzazione mediante radiazioni

Raggi infrarossi

La sterilizzazione viene effettuata in apposite stufe a pressione normale o in stufe sotto vuoto. Poiché i raggi infrarossi hanno notevole capacità di penetrazione, i tempi di esposizione del materiale da sterilizzare (siringhe, vetreria), sono relativamente brevi.

Raggi ultravioletti

Si tratta di radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda compresa tra 100 e 400nm, nella porzione di spettro compresa tra la luce visibile e i raggi X. I raggi ultravioletti vengono convenzionalmente classificati in tre bande:

radiazioni UV-A (UV ad onde lunghe) da 315 a 400 nm;

radiazioni UV-B (UV ad onde medie) da 280 a 315 nm

radiazioni UV-C (UV ad onde corte) da 100 a 280 nm.

Le radiazioni della banda UV-C sono caratterizzate da un marcato effetto germicida, con un picco di massima efficacia in corrispondenza della lunghezza d'onda di 253,7nm. Esse agiscono

danneggiando il DNA e la loro azione antimicrobica è molto rapida. Tuttavia, la loro scarsa capacità di penetrazione ne limita l'azione esclusivamente alle superfici direttamente esposte.

Le radiazioni UV-B e UV-C possono causare irritazione cutanea (eritemi ed infiammazione oculare (congiuntivite) in caso di esposizione non protetta. In presenza di radiazioni dirette o indirette prolungate, è assolutamente indispensabile l'utilizzo di dispositivi di protezione individuale (D.P.I.) (d.Lgs 626/94) come camici, guanti, visiere e occhiali con lenti di vetro comune. Il vetro comune costituisce una protezione efficace contro i raggi ultravioletti, mentre il vetro utilizzato per le lampade deve assicurare la miglior trasparenza possibile alla porzione di spettro utile.

La sorgente di radiazioni UV più comunemente utilizzata è rappresentata da particolari lampade a scarica di vapori di mercurio a bassa pressione. Esse vengono usate per la sterilizzazione dell'aria e dei piani di appoggio in ambienti particolarmente protetti: cabine per manipolazione di farmaci e di materiali biologici (virus, colture cellulari, ecc.), reparti per prematuri, ecc. Poiché gli UV esplicano azione lesiva sulle mucose e sulla pelle scoperta, è necessario evitare la presenza di persone mentre sono in funzione le lampade oppure esse debbono essere opportunamente protette.

Le lampade a raggi ultravioletti possono essere ad irraggiamento diretto o indiretto. Le prime sono installate in plafoniere dotate di un riflettore di alluminio rivolto verso il basso, in modo da irraggiare direttamente l'intero volume di aria del locale. Sono utilizzate in ambienti circoscritti durante l'assenza del personale che vi opera (ad es. di notte).

Le lampade ad irraggiamento indiretto vengono installate a parete o a soffitto a circa due metri di altezza. Durante il loro funzionamento vige l'obbligo di indossare i D.P.I. opportuni quando la luce riflessa, che potrebbe raggiungere l'operatore presente, è superiore ai Valori Limite Soglia (TLV) (Threshold Limit Values) previsti.

I movimenti di convezione spostano continuamente l'aria presente nel locale permettendo una graduale disinfezione dell'intera carica batterica in sospensione.

E' preferibile comunque utilizzare la luce UV in assenza del personale, quindi per periodi limitati. Il limite di tempo può tuttavia provocare una notevole riduzione della loro efficacia. I tempi richiesti per la sterilizzazione dei locali sono lunghi. Occorrono inoltre frequenti interventi di manutenzione per la pulizia dei tubi e delle zone riflettenti.

La mancata sostituzione di un tubo germicida, che ha una vita media di circa 6000 ore, determina l'inefficacia di irradiazione e la conseguente imperfetta di sterilizzazione dell'aria. Le radiazioni UV-C inoltre alterano i materiali e la strumentazione esposti ad esse; pertanto i materiali delicati presenti nell'ambiente devono essere coperti ad ogni accensione della lampada per la sterilizzazione dell'aria dell'ambiente medesimo.

Raggi gamma

Fra le radiazioni ionizzanti, solo i raggi gamma trovano un'applicazione pratica come agenti sterilizzanti. Prodotti dal cobalto 60, sono usati per la sterilizzazione di materiale a perdere (siringhe di plastica, cateteri, fili di sutura, ecc.) già confezionati in buste di plastica impermeabili ai microbi.

Sterilizzazione con agenti chimici

Sterilizzazione con ossido di etilene

Alcuni materiali utilizzati nella fabbricazione di strumentazione medica e chirurgica si alterano alle temperature raggiunte in autoclave o nella stufa a secco. Per la sterilizzazione di tali strumenti (es. sonde, tubi endotracheali, ecc) si ricorre all'ossido di etilene, un etere ciclico con formula C_2H_2O che passa allo stato gassoso alla temperatura di 10,73 °C. Esso viene distribuito in forma liquida in bombole di acciaio. Questo gas esercita una notevole azione irritante sulle mucose e sulla pelle, mentre con l'aria forma miscele esplosive. Pertanto l'ossido di etilene deve essere usato con molta cautela.

Sanation

Secondo la definizione di Dosch, "sanation" è la distruzione efficace di tutti gli agenti infettivi e di ogni altro protozoo, batterio o virus su siringhe, cannule, guanti di gomma, strumentazione e materiale per bendaggio, che possa probabilmente causare danno alla salute umana durante il trattamento chirurgico. L'effetto della "sanation" corrisponde alla definizione probabile di sterilizzazione per chirurgia e altri scopi clinici e non comprende, quindi, i germi e le spore non patogene per l'uomo.

La sanation risulta effettuata quando sono distrutte le spore che causano il carbonchio (*B. anthracis*), il tetano (*C. tetani*), la gangrena gassosa (*Clostridium perfringens*) e il botulismo (*Clostridium botulinum*) ed anche quelle con resistenza mostrata dai tipi *Bacillus mesentericus*. Questi sono i batteri più resistenti tra ogni tipo di agente patogeno. I virus e le forme vegetative dei microrganismi conosciuti sono, naturalmente, molto meno resistenti e vengono eliminati più facilmente.

In funzione dell'efficienza della fonte di calore, la durata totale della procedura (dalla introduzione fino alla rimozione del materiale che deve essere privato dei germi) per la "sanation" (sterilizzazione per scopi chirurgici o clinici) è di 30-40 min, mentre per la sterilizzazione (secondo gli standards microbiologici) è di 40-50 min. (fig. 10)

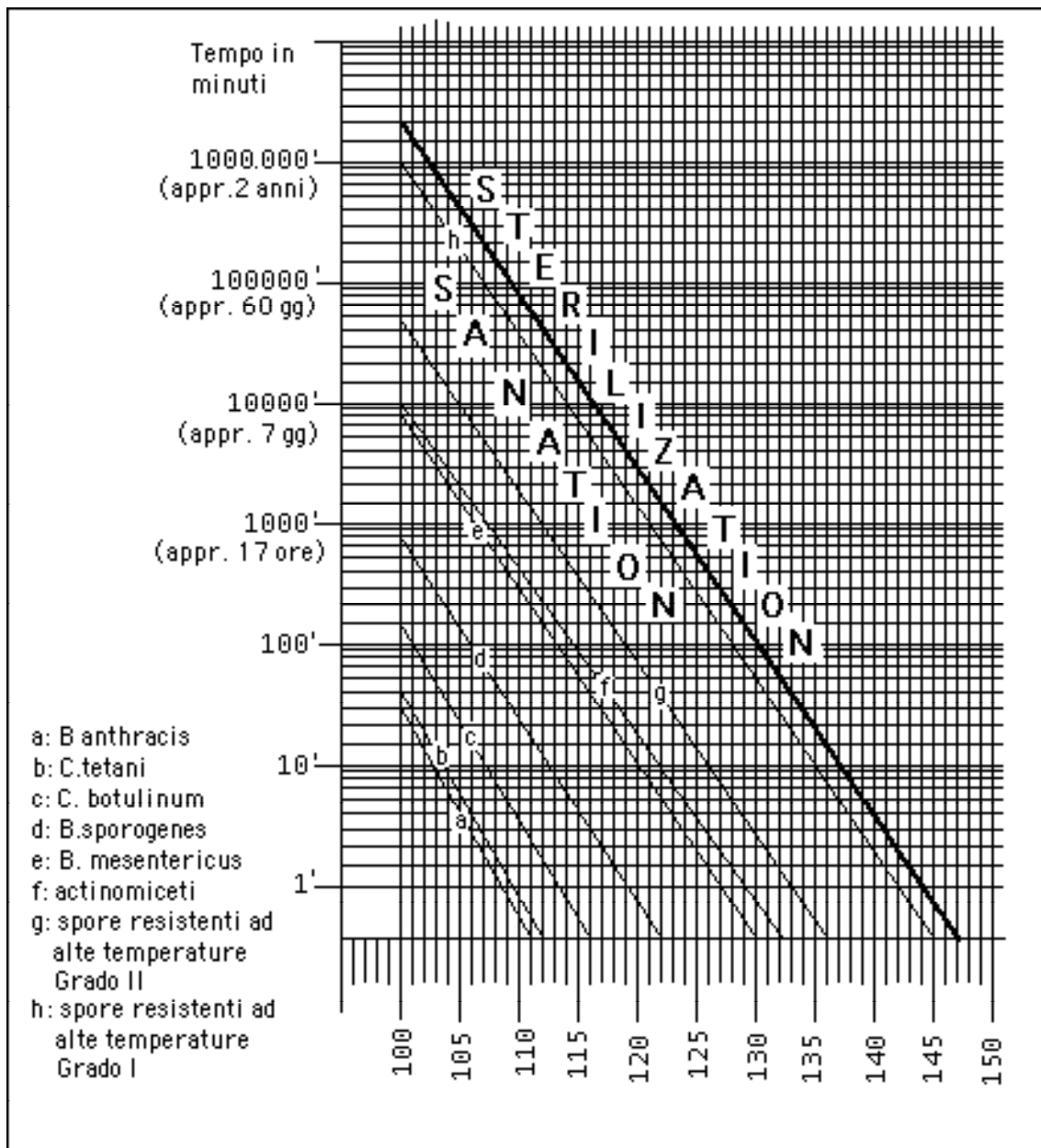


fig.10: relazione tra sterilizzazione e sanation secondo Dosch.

Disinfezione

Un trattamento di disinfezione ha come scopo immediato quello di distruggere gli agenti patogeni che sono presenti, o si presume essere presenti, in un determinato ambiente o substrato. Non si pretende, comunque, la distruzione di tutti i microrganismi, come è nel caso della sterilizzazione, ma soltanto di quelli che si ritiene essere dannosi per l'uomo in quelle condizioni.

Alcuni agenti fisici e chimici esplicano una azione drastica sui microrganismi danneggiandone le molecole che li compongono. Il calore, ad esempio, coagula le proteine; gli alcoli, il fenolo, e alcune altre sostanze, ad elevate concentrazioni, alterano lo stato colloidale del protoplasma batterico. Altri disinfettanti chimici hanno una azione più specifica sulle proteine enzimatiche; gli ioni di metalli pesanti (mercurio, argento, rame), ad esempio, si legano ai gruppi sulfidrilici -SH degli enzimi e dei coenzimi contenenti cisteina, che, pertanto, risultano inattivi; sugli stessi gruppi -SH agiscono i disinfettanti con effetto ossidante, che, liberando ioni idrogeno, formano

legami disolforici inattivi. la formaldeide e la glutaraldeide agiscono sui microrganismi alchilando i gruppi proteici aminici e sulfidrilici e legando gli atomi di azoto delle basi puriniche degli acidi nucleici. Altri punti di attacco dei disinfettanti chimici sono la membrana cellulare, la cui alterazione porta alla soppressione della sua funzione di barriera selettiva e di trasporto attivo, e la parete cellulare, la cui distruzione ha come conseguenza la lisi osmotica della cellula batterica.

Alcuni degli effetti descritti sono gravi ed irreversibili, pertanto alcuni disinfettanti esplicano un'azione battericida. Altri disinfettanti provocano invece effetti reversibili, entro certi limiti, come l'arresto della crescita della cellula batterica; questi disinfettanti hanno quindi soltanto azione batteriostatica, sicché la crescita batterica può riprendere se il disinfettante viene allonatao o neutralizzato.

Nel caso dei virus, l'assenza di enzimi di membrana e di parete cellulare può spiegare perché la maggior parte dei disinfettanti ha su di essi un effetto minore; per i virus sono necessarie dunque maggiori concentrazioni di disinfettanti o di agenti chimici più energici per produrre la denaturazione delle proteine del capsido virale.

Disinfezione con agenti fisici

Con la disinfezione ci si prefigge di distruggere i microrganismi che causano le malattie infettive, per impedirne la persistenza e la diffusione nell'ambiente. Essa viene attuata mediante mezzi fisici o chimici opportunamente scelti in funzione dell'agente patogeno che si vuole distruggere. Solo così si potrà evitare l'uso irrazionale ed immotivato di insetticidi, che talvolta vengono inopportunamente adottati laddove basterebbe un semplice ed innocuo disinfettante fisico.

Gli stessi agenti fisici menzionati per la sterilizzazione possono essere usati anche per la disinfezione. In particolare, si può utilizzare il calore a temperature più basse di quelle richieste per raggiungere la sterilità.

Un modo semplice per disinfettare oggetti vari nell'ambito domestico (es. stoviglie, biancheria, ecc.) è quello di immergerli in acqua bollente per almeno 5 minuti. In tal modo si ha la garanzia dell'uccisione dei batteri patogeni in forma vegetativa (compreso il bacillo tubercolare) e dei virus, con esclusione del virus dell'epatite che, se protetto da materiale proteico, può resistere a lungo e per la cui inattivazione è necessario prolungare l'ebollizione almeno di altri 5 minuti. L'aggiunta di deboli concentrazioni di disinfettanti chimici (clorobenzolo allo 0,2%, clorocresolo allo 0,2 %, nitrato di fenilmercurio allo 0,001% o carbonato sodico al 2%) aumenta l'efficacia dell'ebollizione.

Disinfezione con agenti chimici

La maggior parte dei disinfettanti ha effetti tossici. Nel maneggiarli, si dovrebbero indossare guanti, grembiuli e protezioni per gli occhi; ciò è opportuno soprattutto quando i disinfettanti concentrati vengono diluiti per l'uso.

Alcuni disinfettanti tradizionali trovano ancora oggi larga applicazione ma a questi ne sono stati affiancati alcuni più recenti, mentre altri sono caduti in disuso o trovano un uso molto limitato. fra questi si possono citare, come esempi, gli acidi forti (acido solforico, acido cloridrico) e gli alcali (idrossido di sodio, di potassio, di calcio) che occasionalmente ed in mancanza di meglio possono servire per la disinfezione di ambienti rustici. Anche i composti del mercurio trovano ormai scarsa applicazione: il cloruro mercurio o sublimato corrosivo ($HgCl_2$), che agisce legandosi ai gruppi -SH

degli enzimi o, a concentrazioni maggiori, coagulando le proteine, è ormai abbandonato sia per la sua tossicità sia perché la sua azione è lenta ed è ostacolata dalla presenza di sostanze organiche; fra i composti organici solo il mertiolato (etil-mercurio-tio-salicilato sodico) è ancora usato allo 0,001-0,02%, per la preservazione di sieri e vaccini. Un uso limitato come antisettici hanno alcuni composti dell'argento: il nitrato d'argento, il protargolo e l'argirolo.

Cloro

Il cloro è un disinfettante universale; esso è attivo contro tutti i microrganismi. E' normalmente disponibile come ipoclorito di sodio (NaClO), con varie concentrazioni di cloro. E' un forte agente ossidante ed è corrosivo per i metalli. Le soluzioni di ipoclorito possono perdere gradualmente di forza per cui è necessario preparare quotidianamente soluzioni fresche. Una soluzione per usi generici di laboratorio deve avere una concentrazione di 1 gr/litro (1000 ppm) di cloro disponibile. L'ipoclorito di sodio contenente 5gr/litro (5000 ppm) di sodio è raccomandato come il miglior disinfettante in situazioni di emergenza che coinvolgano virus di gruppo IV. Le soluzioni in commercio sia per uso di laboratorio che per uso domestico (candeggina) contengono 50gr/litro (50000 ppm) di cloro disponibile e vanno quindi diluite ad 1:50 o 1:10 per l'uso. I granuli o le pastiglie di ipoclorito di calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ contengono circa il 70% di cloro disponibile.

Il dicloro iso cianurato di sodio (NaCNCl_2), noto comunemente come NaDCC è reperibile sotto forma di polvere contenente l'equivalente di 1,5 grammi di cloro disponibile. Da una a quattro pastiglie disciolte in un litro di acqua forniscono le concentrazioni necessarie.

Le clorammine, derivano dall'ammoniaca per sostituzione di uno o tutti e tre gli atomi di idrogeno con cloro. La polvere di clorammina (NH_2Cl) contiene circa il 25% di cloro disponibile. Dal momento che essa libera cloro più lentamente degli ipocloriti, per raggiungere la medesima efficacia sarà necessaria una concentrazione superiore, ma esercita una azione battericida prolungata ed è poco irritante. D'altra parte le soluzioni di clorammina non vengono inattivate dalla materia organica quanto gli ipocloriti; quindi una concentrazione di 20gr/litro sarà adatta ad affrontare un ampio spettro di contaminazioni.

Il cloro gassoso è utilizzato per la disinfezione delle acque. Allo stesso scopo si usa il biossido di cloro (ClO_2), che in ambiente alcalino ha un'azione più rapida e non produce sapori ed odori sgradevoli. L'ipoclorito di sodio, oltre che per la clorazione dell'acqua, viene usato nell'ambito domestico per la disinfezione di stoviglie, biancheria, superfici, dato che il suo basso costo e la facilità d'uso; esso è contenuto, assieme ad altri ipocloriti, nelle comuni varechine o candeggine.

Iodio e iodofori

Lo iodio è un composto poco solubile in acqua e facilmente solubile in alcol. L'azione dello iodio è simile a quella del cloro: è un disinfettante energico ed esplica una azione battericida e sporicida ad ampio spettro. Le superfici pulite possono essere trattate efficacemente con soluzioni che contengono 0,075gr/litro (75 ppm) di iodio disponibile, ma potrebbero presentarsi delle difficoltà qualora fossero presenti quantità considerevoli di proteine.

Gli iodofori non sono veri e propri composti dello iodio, bensì miscele di iodio e composti tensioattivi: anionici, cationici e non ionici. Per il lavaggio delle mani o come sporicidi, gli iodofori

possono essere diluiti in etanolo. Una soluzione contenente 0,45gr/litro (450 ppm) di iodio disponibile risulta efficace contro i virus Ebola e Lassa. Lo iodio povidone (PVI) ha un'attività ad ampio spettro e contiene un agente imbibente. La formulazione più comune è una soluzione al 10% (1% di iodio). Per l'uso essa può essere diluita a quattro volte il suo volume con acqua bollita.

Composti fenolici

I fenoli trovano impiego nel campo della disinfezione dal 1867, anno in cui Lister mise in evidenza le loro proprietà battericide. I fenoli non alterano i materiali con i quali vengono in contatto; il loro uso, tuttavia è limitato dal loro odore sgradevole, penetrante e persistente. Essi sono attivi contro tutte le forme vegetative di microrganismi ma non contro le spore. La loro attività nei confronti dei virus è variabile. Molti disinfettanti commerciali sono basati su composti fenolici e possono essere usati in sostituzione degli ipocloriti. Al gruppo dei composti fenolici appartengono l'acido fenico (grezzo e puro), i cresoli e i difenoli che derivano dalla distillazione del catrame di carbon fossile.

Alcoli

Sono correntemente usati l'alcool etilico (etanolo) e l'alcol isopropilico (isopropanolo). Essi hanno proprietà disinfettanti simili. Essi esplicano un intenso e rapido effetto battericida sulle cellule in forma vegetativa, batteri, funghi e virus, grazie alla loro azione denaturante sulle proteine, ma non hanno alcuna attività sulle spore. La loro efficacia disinfettante è massima quando sono diluiti in acqua al 50-60%, mentre è molto scarsa quella degli alcoli anidri: in pratica si usano soluzioni al 70% per la disinfezione della pelle e dei termometri, ma a questa concentrazione gli alcoli sono e spesso inefficaci sulla maggior parte dei virus. Miscelati insieme ad altri agenti gli alcoli sono più efficaci che da soli. Solo particolarmente efficaci soluzioni di alcol al 70% che contengano 100 gr di formaldeide/litro oppure 2 gr/litro (2000 ppm) di cloro. Gli alcoli mescolati con i composti quaternari dell'ammonio potenziano l'attività di questi ultimi.

Aldeidi

La sostanza più comunemente usata è l'aldeide formica (H_2CO). Sotto forma di gas è rapidamente attiva su tutti i microrganismi, eccetto che alle basse temperature ovvero al disotto dei $20^{\circ}C$. Viene commercializzata sotto forma del suo polimero solido, la paraformaldeide, in fiocchi o in pastiglie, o come formalina, una soluzione al 37% del gas in acqua contenente metanolo come stabilizzante. All'umidità relativa del 70%, essa è in grado di inattivare anche le spore, purché la sua azione si prolunghi per tempi adeguati e avvenga a temperature superiori ai $40^{\circ}C$. La formalina al 5% può essere utilizzata come disinfettante liquido. La formaldeide è un gas pericoloso e irritante, sospettato di essere cancerogeno.

Anche la glutaraldeide è attiva contro tutti i microrganismi. E' reperibile in soluzione al 20% e nella maggior parte dei prodotti in commercio ha bisogno di essere attivata prima dell'uso con l'aggiunta di un composto bicarbonato che viene fornito con essa e che alcalinizza la soluzione. La soluzione attivata va usata entro due settimane e va eliminata se diventa torbida. La glutaraldeide è tossica, irritante e mutagena. Va evitato ogni contatto con pelle, occhi e vie respiratorie.

Saponi

Sono costituiti da miscele di sali degli acidi grassi, (acidi oleico, palmitico e stearico), che si ottengono trattando i grassi animali o vegetali con idrato sodico (soda caustica), o con idrato di potassio (potassa) per ottenere rispettivamente i saponi duri, o i saponi molli. Essi hanno la proprietà di abbassare la tensione superficiale dell'acqua e, pertanto, esplicano un'azione detergente e sgrassante, con cui si ottiene l'allontanamento meccanico di parte dei microrganismi presenti sulla pelle o sugli oggetti da detergere (biancheria, pavimenti, ecc.).

Disinfezione delle mani

La disinfezione delle mani del chirurgo per la preparazione all'intervento sul paziente ha lo scopo di eliminare i microrganismi transitori e di ridurre il numero di quelli residenti. Con un opportuno trattamento si potrà ottenere una riduzione di oltre il 99,99%, ma non la sterilizzazione della pelle. La preparazione inizia con la pulizia per 2-3 minuti con sapone e spazzolino, a meno che non si usino dei composti, come i detergenti anfoteri, che uniscono l'azione detergente all'azione disinfettante. Diversamente, dopo un accurato risciacquo, si procederà per almeno 5 min alla disinfezione, che a seconda del prodotto usato, sarà attuata con immersione in una bacinella o mediante strofinamento. I disinfettanti più idonei sono l'alcool etilico al 70%, l'alcool isopropilico al 50%, gli iodofori e la clorexidina. Quest'ultima offre il vantaggio dell'azione persistente dovuta alla stratificazione delle molecole del disinfettante sulla pelle.

Disinfestazione

La disinfestazione si attua per eliminare da un determinato ambiente la presenza di organismi pluricellulari.

Anche per la disinfestazione si usano diversi agenti fisici e chimici secondo modalità di impiego che devono tener conto della biologia del parassita che si vuole distruggere. Solo così si potrà evitare l'uso improprio di altri composti tossici, come gli insetticidi. Sarebbe inutile ad es. disinfestare un'aula dopo aver scoperto dei casi di pediculosi fra gli alunni; infatti gli agenti responsabili, (*Pediculus capitis*, che provoca la *tinea capitis*) spesso non riescono a sopravvivere quando si staccano dall'ospite ma muoiono se non passano su un altro ospite. Alcuni gas tossici come l'anidride solforosa, l'acido cianidrico, la cloropicrina ed il bromuro di metile hanno un'azione letale sia per gli insetti che per i roditori e sono stati denominati disinfestanti integrali.

Profilassi Immunitaria.

Con la profilassi immunitaria si mira a stabilire uno stato di resistenza specifica verso un determinato agente di infezione mediante la somministrazione di vaccini (profilassi immunitaria attiva); in casi particolari si può far ricorso all'uso di immunoglobuline o di sieri immuni (profilassi immunitaria passiva) per proteggere in modo specifico e mirato un individuo esposto ad imminente pericolo di contrarre una determinata malattia infettiva.

Ambiente di lavoro

La consapevolezza dell'esistenza del rischio di contaminazione da agenti biologici implica, innanzitutto, la realizzazione di un ambiente di lavoro ottimale; quindi l'adozione di norme e attrezzature tecniche che salvaguardino la salute dell'operatore; infine la necessità di un controllo periodico delle strutture e degli strumenti,

Un ambiente confortevole è fondamentale per le condizioni di sicurezza del lavoro. Il grande sviluppo che ha avuto in questi ultimi anni l'attività di laboratorio ha messo in evidenza la necessità di attenersi, nella costruzione di nuovi edifici, alla massima flessibilità per poter rendere possibili le eventuali modifiche richieste nel corso del tempo da nuove esigenze di attrezzature e organizzazione.

I requisiti richiesti affinché le condizioni ambientali di base siano confortevoli, si possono così riassumere:

a) Adeguati ricambi d'aria. Sono necessari almeno 10-15 cambi per ora del 100% di aria fresca che assicuri il residuo minimo di odori, polveri, aerosols (Chatigny). L'eventuale condizionamento d'aria deve essere realizzato con filtri appropriati e manutenzione periodica e deve garantire anche un controllo dell'umidità dell'aria ambientale (Herman).

b) Adeguata illuminazione naturale. La luce solare diretta ha un'azione decontaminante sulla flora batterica ambientale; il Micobatterio tubercolare, che è capace di sopravvivere per mesi nell'ambiente allo stato umido o secco, è ucciso dalla luce solare diretta entro uno o due giorni.

c) Adeguato isolamento. Pareti, soffitti, pavimenti devono essere ben isolati dal suolo, lisci e facilmente lavabili. Porte e finestre devono avere una buona tenuta di chiusura.

d) Adeguate superfici di lavoro. I banconi di lavoro devono essere rivestiti di materiale liscio, facilmente lavabile e resistente all'azione corrosiva di acidi ed alcali: rispondono a questi requisiti alcuni tipi di materiale plastico e l'acciaio inox.

e) Adeguati servizi. Ogni locale deve essere fornito di lavandini, di distributore di sapone disinfettante e di contenitori per asciugamani monouso (salviette di carta).

f) Razionale ubicazione dei laboratori. La distribuzione dei vari tipi di lavoro nei locali disponibili deve rispondere a requisiti di sicurezza: ad esempio i locali dove si presume la possibilità di elevate contaminazioni dovrebbero essere isolati da quelli dove la possibilità di contaminazione è minore. È indispensabile predisporre un'area possibilmente isolata da adibire a zona di accettazione dei campioni da esaminare (che sono da considerare sempre potenzialmente infetti), dove l'equipe addetta possa svolgere il lavoro di smistamento dei campioni e delle relative richieste. Anche questo locale dovrà essere fornito di lavandino, distributore di asciugamani monouso e di bidoni a pedale con sacchi di plastica per lo scarto del materiale infetto (campioni non accettabili, garze, guanti monouso).

g) Adeguata eliminazione dei rifiuti. Tutti i rifiuti provenienti da laboratori ove si manipoli materiale biologico devono essere considerati potenzialmente infetti.

Rifiuti solidi: se il laboratorio non è fornito di un sistema adeguato per l'eliminazione dei rifiuti, che li convogli direttamente all'esterno attraverso una rete di tubature, essi dovranno essere raccolti in appositi sacchi di plastica posti in contenitori di cartone facilmente riconoscibili, che verranno inviati all'inceneritore. I materiali e le colture, prima di essere scartati, dovranno essere disinfettati o

sterilizzati in autoclave o decontaminati. E' opportuno comunque prendere le opportune precauzioni perché i sacchi di rifiuti non siano fonte di contaminazione dell'ambiente esterno al laboratorio.

Rifiuti liquidi: devono essere sterilizzati in autoclave o decontaminati con disinfettanti prima della loro eliminazione. Per l'eliminazione del materiale infetto è necessario accertarsi che tutto il materiale stesso si trovi in contenitori chiusi ermeticamente prima del trasferimento dalla cabina di sicurezza all'autoclave per la sterilizzazione.

Bibliografia

Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Categorization of pathogens and categories of containment. London, Her Majesty's Stationery office, 1991.

Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. Istituto Superiore di Sanità (Suppl al n.2) 1-122 1995

Autori Vari: Cappe a flusso. Da Omnia Lab: Catalogo manuale operativo di Scienza applicata pp 190-212. International PBI SpA

Bibliografia

Autori Vari: Laboratory management of agents associated with hantavirus pulmonary syndrome: interim biosafety guidelines. Centers for Disease Control and Prevention: MMWR Recomm Rep. 43, 1-7, 1994

Autori vari: Clinical Microbiology Procedures Handbook of American Society for Microbiology: Laboratory safety Management Update: Aerosol-borne Microorganism.

Barbuti S., Bellelli E., Fara GM. Giammanco G., Igiene, Monduzzo Editore, 1996.

Battaglia A.: Definizione e applicazioni delle cappe a flusso laminare secondo gli standard internazionali: Consorzio Distribuzione Laboratorio (CDL), pg 6 settembre 2001

Block S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 3rd ed. Philadelphia, Lee & Febinger, 1983.

Bretherick L. Hazards in the chemical laboratory. London, Butterworths, 1981.

Briton M. Miller Laboratory safety principles and Practices.- American Society for microbiology, Washington D.C. USA

Chatigny, M. A., Dunn, S., Ishimaru, K., Eagleson, J. A., Prusiner, S. B.: Evaluation of a class III biological safety cabinet for enclosure of an ultracentrifuge : Appl Environ Microbiol, 38 (5), 934-9 1979

Chatigny, M. A., Sarshad, A. A., Pike, G. F.: Design and evaluation of a system for thermal decontamination of process air, Biotechnol Bioeng, 12 (4), 483-500, 1970

Cimons, M.: NIH (National Institute of Health- USA) opens top level biosafety facility: Nature Medicine. 4, 136, 1998.

Citerni M.: Manuale di igiene: medicina preventiva e sociale. IV edizione. Iapadre editore. 1985.

Collins C.H. Laboratory acquires infections: history, incidence, causes and prevention, 2nd ed. London Butterworths, 1988.

Decreto Legislativo 19 settembre 1994, n°626. Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE 89/655/CEE 89/656/CEE 90/269/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE e 90/679/CEE riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute ed i lavoratori sul luogo di lavoro. Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana, Serie generale, suppl. ord. Al n.265 del 12 novembre 1994.

DeRiemer, K., Moreira, F. M., Werneck Barreto, A. M., Ueleres Braga, J.: Survey of mycobacteriology laboratory practices in an urban area with hyperendemic pulmonary tuberculosis: Int J Tuberc Lung Dis. 4, 8, 776-83, 2000

Dosch F. Sterilization for surgical purposes Klin Medizin, 11, 521, 1956

Dosch F: on sanitation, sterilization and a new germ-destroying apparatus Wiener klinische wochenschrift, (Vienna Clinical Weekly) 70, heft 38, 637, 1958

Enserink, M.: Virology. The boom in biosafety laboratories. *Science*. 288, 5470, 1320-2., 2000

Furr A.K. ed CRC handbook of laboratory safety 3rd ed. Boca Raton, CRC press, 1990.

Gardner J. F. Peel M.M. Introduction to sterilization and disinfection. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1986.

Health and Welfare Canada. Laboratory biosafety guidelines. Ottawa, Laboratory Centre for Disease Control, 1990.

Heirholzer J.C.: biological contaminants in indoor environments: viruses, mycoplasmas as pathogenic contaminants in indoor environments, American Society for testing and materials

Hermann, R.: [Significance of surface devices for microbial contamination of room air and surfaces in intensive care units, and long-term respiration words], *Z Gesamte Hyg*, 18 (9), 651-3, 1972

Ligugnaga R., Zanin F.: La sicurezza nel laboratorio di analisi in accordo al D.L.626/94 Eds International PBI SpA, 1996.

Ministry of health of Sweden: Arbetarskyddsstyrelsens kungorelse med foreskrifter om mikroorganismen samt allmana rad om tillampningen av foreskrifterna (Dichiarazione del comitato per la Protezione dei Lavoratori contenenti norme sui microrganismi, con suggerimenti generali sulla loro applicazione, Stockolm, 1988.

Petrosillo, N., Puro, V., De Carli, G., Ippolito, G.; Risks faced by laboratory workers in the AIDS era. *J Biol Regul Homeost Agents*. 15, 243-8, Year 2001

Richmond, J. Y., Knudsen, R. C., Good, R. C., : Biosafety in the clinical mycobacteriology laboratory. *Journal Clin Lab Med*, 16, 527-50, 1996

Schmid, I., Nicholson, J. K., Giorgi, J. V., Janossy, G., Kunkl, A, Lopez, P. A., Perfetto, S., Seamer, L. C., Dean, P. N.: Biosafety guidelines for sorting of unfixed cells: *Journal Cytometry*, 28, 99-117, 1997

Sewell, D. L.: Laboratory-associated infections and biosafety .*Journal Clin Microbiol Rev*, 8, 389-405, 1995

Standards Association of Australia. Biological safety cabinets: installation and use. Sydney, New South Wales, 1983 (AS2647).

Tomaselli G. il problema della qualità dell'aria-rischio biologico di trasmissione di infezione. kover srl Consorzio Distribuzione Laboratorio informa pg 4-5 settembre 2001

US Department of Health and Human Service. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Washington DC, Center for Disease Control and National Instiues of Health, 1988

Vidal, D. R., Paucod, J. C., Thibault, F., Isoard, P.. [Biological safety in the laboratory. Biological risk, standardization and practice]. *Journal Ann Pharm Fr*, 51, 154-66, 1993.

Yamamoto, H., Sato, H., Yagami, K., Arikawa, J., Furuya, M., Kurosawa, T., Mannen, K., Matsubayashi, K., Nishimune, Y., Shibahara, T., Ueda, T., Itoh, T.: Microbiological contamination in genetically modified animals and proposals for a microbiological test standard for national universities in Japan. *Journal Exp Anim*. 50, 5, 397-407, 2001

