

Cristiano Vergani  
Responsabile R & D  
Deparia Engineering S.r.l.  
E-mail: cristiano.vergani@deparia.com

## **La sicurezza nei laboratori microbiologici**

*In molti laboratori si manipolano e si conservano virus micidiali in condizioni di sicurezza a volte insufficienti: per evitare incidenti catastrofici occorre seguire delle regole ben precise.*

I laboratori di microbiologia rappresentano un ambiente di lavoro molto particolare, caratterizzato da un rischio elevato di contagio: in passato vi sono stati numerosi incidenti, alcuni dei quali molto gravi, a carico del personale, dei loro famigliari e della popolazione in generale, causati da agenti biologici sfuggiti al controllo. Tubercolosi, epatite, Febbre Q, shigellosi, brucellosi, sono solo alcuni esempi di malattie infettive di frequente riscontro negli addetti ai lavori, causate da agenti ritenuti relativamente pericolosi e perciò a volte manipolati con disattenzione. In alcuni casi, le procedure esistenti si sono rivelate inadeguate al contenimento di agenti biologici di nuova comparsa o non sufficientemente conosciuti: nel corso degli anni '80 le numerose infezioni accidentali con il virus HIV hanno dimostrato quanto possa essere pericolosa per l'intera comunità umana la conduzione approssimativa di un'emergenza biologica.

Negli ultimi decenni, un nuovo, insidioso pericolo ha fatto la sua comparsa nei laboratori: i microrganismi geneticamente modificati, i quali devono essere rigorosamente confinati fino alla sicura identificazione degli eventuali pericoli connessi alla loro diffusione (anche per questi agenti biologici la cronaca a già riportato casi di incidenti,

alcuni clamorosi, legati alla diffusione irresponsabile, segno evidente della mancanza di efficaci norme di sicurezza). Per esempio, una nuova muffa messa a punto per attaccare selettivamente le piante di canapa ad alto contenuto di THC (l'agente psicoattivo presente nella marijuana), è stata sperimentata da una Agenzia Federale degli Stati Uniti in alcuni campi vicini al confine con il Canada, provocando danni gravissimi nelle piantagioni di canapa industriale canadese, una specie vegetale che si credeva immune. L'impatto dell'ingegneria genetica sugli aspetti legati alla sicurezza biologica rappresenta veramente un capitolo vasto, in gran parte ancora da scoprire, che ispira comunque la necessità di un livello di attenzione estremamente elevato: basti pensare che l'impianto di geni estranei nelle cellule ospiti viene effettuato per mezzo di virus "inoculatori", potenzialmente in grado, in caso di diffusione accidentale, di attaccare cellule ben diverse da quelle previste come bersaglio, con conseguenze inimmaginabili.

Una fonte di notevole preoccupazione è rappresentata dalla presenza di agenti infettanti estremamente pericolosi nei laboratori dedicati durante la Guerra Fredda alla messa a punto delle armi biologiche: molti di questi laboratori si trovano oggi in condizioni precarie o di abbandono, specialmente nell'ex U.R.S.S., di frequente in uno stato di scarsa o negligente applicazione delle norme di sicurezza.

### ***Il ruolo del trattamento dell'aria***

Nella grande maggioranza dei casi, l'aria rappresenta il principale veicolo della contaminazione: l'aerosol infetto provocato da una provetta che cade o da una fonte qualsiasi lambita da un flusso d'aria può diffondere l'agente biologico nell'ambiente interno al laboratorio, addirittura nell'intero edificio e persino all'esterno, veicolato dall'impianto di ventilazione. Per questo motivo, all'interno dei laboratori si pone grande attenzione alla progettazione ed alla corretta esecuzione e manutenzione degli impianti di

trattamento dell'aria, in quanto essi rappresentano un fattore essenziale di sicurezza. Esistono delle regole codificate ben precise da seguire in base alle caratteristiche dell'agente biologico trattato, che prescrivono tipologie diverse d'impianto da adottare a seconda della pericolosità e dell'infettività dell'agente. In generale si può dire che l'esigenza principale è quella di compartimentare gli ambienti ed all'interno di questi, isolare le singole postazioni di lavoro all'interno di strutture precisamente differenziate in base al livello di pericolosità presente.

### ***Classificazione del rischio ed equipaggiamento prescritto***

La pericolosità degli agenti biologici viene classificata in quattro livelli, caratterizzati dall'obbligo di adottare specifiche misure di difesa e prevenzione nella pratica usuale di laboratorio (Tabella 1). Naturalmente a pericolosità crescenti corrispondono misure più restrittive: per agenti non identificati o dalle caratteristiche ancora ignote deve essere considerato il livello massimo. Come si può vedere, per i livelli 3 e 4, caratterizzati da una trasmissibilità tramite aerosol, il trattamento dell'aria riveste una importanza fondamentale.

Lo strumento basilare per contenere il rischio biologico nei laboratori è costituito dalle cappe, disponibili in tre classi di esecuzione (Tabella 2). Le cappe di classe I e II, in unione con le procedure standard, possono garantire sicurezza sufficiente per la manipolazione di microrganismi ad elevato rischio di contaminazione (livello 2 e 3 di pericolosità biologica). La velocità frontale dell'aria in ambedue le classi varia da 0,4 a 0,5 m/s, sufficiente ad impedire la diffusione di eventuali aerosol generati all'interno. Le cappe di classe II in più sono in grado di preservare il materiale biologico stesso da contaminazioni esterne, attraverso la protezione di un flusso laminare di aria proveniente da un filtro HEPA.

Le cappe di classe III provvedono invece il massimo livello possibile di protezione,

isolando completamente il materiale biologico dall'ambiente circostante.

Complemento essenziale alla sicurezza delle operazioni sotto cappa è l'uso generalizzato della disinfezione del materiale di uso comune nel laboratorio, operata con mezzi fisici (calore, con stufe a secco od autoclavi a vapore) o chimici, tramite appositi disinfettanti da scegliere con attenzione in base ai diversi agenti biologici coinvolti (Tabella 3).

### **Cappe di classe I**

Sono costituite da un piano di lavoro chiuso in una cabina trasparente, a pressione negativa, dotata di apertura anteriore scorrevole: in posizione di massima apertura, la velocità dell'aria in ingresso non deve essere inferiore a  $0,4 \text{ m/s}$  (Figura 1). L'aria aspirata all'interno della cabina viene passata attraverso un filtro HEPA ed espulsa all'interno del laboratorio o portata all'esterno. Queste cappe sono adatte per lavori su materiali biologici a basso rischio o per ospitare piccoli apparecchi come miscelatori e diluitori. Non devono essere impiegati per materiali suscettibili di contaminazione, in quanto l'aria proveniente dal laboratorio non viene filtrata. Opzionalmente possono essere dotate di un pannello anteriore con apertura ridotta per aumentare la velocità dell'aria aspirata, oppure con guanti manipolatori in gomma per una maggiore protezione. Non devono essere impiegate in presenza di sostanze tossiche volatili e radionuclidi.

### **Cappe di classe II**

Nella classe II, la minima velocità frontale dell'aria è maggiore, intorno a  $0,5 \text{ m/s}$ ; inoltre parte dell'aria filtrata viene utilizzata per generare un flusso d'aria laminare a protezione del materiale sotto cappa. Sono suddivise in un tipo A (Figura 2) ed in un tipo B (Figura

3). Nel tipo A l'aria viene ricircolata all'interno, ed è possibile lo scarico dell'aria filtrata all'interno del laboratorio; nel tipo B esiste una zona interna caratterizzata da una pressione relativamente più negativa del resto del volume sotto cappa; inoltre, lo scarico dell'aria è possibile solo verso l'esterno. L'impiego di sostanze tossiche volatili e di radionuclidi è permesso solo nel tipo B.

### ***Cappe di classe III***

Si tratta di cabine completamente chiuse a tenuta ermetica, all'interno delle quali le operazioni manuali vengono effettuate esclusivamente per mezzo di guanti di gomma applicati alle pareti (Figura 4). Il volume interno viene mantenuto in depressione: l'aria immessa viene filtrata da un filtro HEPA mentre l'aria in uscita viene fatta passare attraverso due filtri HEPA in serie, oppure un filtro HEPA seguito da un dispositivo inceneritore, prima dell'espulsione all'esterno. Queste cappe rappresentano il massimo livello di sicurezza disponibile per lavorare sugli agenti biologici di livello 3 e 4. Tutti i dispositivi necessari alle operazioni di laboratorio (incubatori, refrigeratori, centrifughe ecc.) devono essere entrocontenuti nella cabina, che può raggiungere dimensioni importanti: spesso si utilizzano più cabine interconnesse tra loro. La cabina o l'insieme delle cabine deve obbligatoriamente essere connesso, tramite un sistema di doppi sportelli a tenuta, con uno spazio attrezzato dotato di autoclave e di vasche per la disinfezione dei materiali in transito verso l'interno e l'esterno della struttura.

### ***Tute a pressione positiva***

Lo stesso grado di protezione assicurato dalle cappe di classe III può essere ottenuto attraverso l'impiego di tute ventilate a tenuta ermetica, mantenute in pressione positiva.

La ventilazione è assicurata da un respiratore portatile. Equipaggiato in questo modo, all'interno di un locale dalle caratteristiche assimilabili ad una grande cabina di classe III, il personale può lavorare con agenti biologici di livello 3 e 4 anche con cappe di classe I e II. L'intero ambiente è tenuto in pressione negativa ed è connesso con l'esterno tramite un sistema di doppie porte a tenuta ermetica: nell'anticamera di passaggio sono installate delle docce chimiche di disinfezione che servono a decontaminare l'intera superficie esterna della tuta, sia in ingresso che in uscita. L'aria in espulsione viene filtrata attraverso due sistemi HEPA in serie.

Livello di pericolosità biologica	Agenti	Metodologie	Accorgimenti di sicurezza primari	Accorgimenti di sicurezza secondari
<b>1</b>	Sicuramente non pericolosi per una persona sana	Standard di laboratorio microbiologico	Nessuno in particolare	Vasca di contenimento
<b>2</b>	Causa di malattia nell'uomo, veicolati per autoinoculazione, ingestione, esposizione di mucose	Come il precedente, inoltre: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ accesso limitato</li> <li>▪ cartelli di pericolo</li> <li>▪ massima precauzione manuale di sicurezza per definire le esatte procedure di decontaminazione e di sorveglianza sanitaria</li> </ul>	Mezzi fisici di contenimento per eventuali versamenti; cariche da laboratorio, guanti e maschera facciale	Come il precedente, inoltre: autodave a disposizione
<b>3</b>	Veicolati per inalazione di aerosol, potenzialmente mortali	Come i precedenti, inoltre: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ accesso controllato</li> <li>▪ decontaminazione dei rifiuti</li> <li>▪ decontaminazione degli indumenti</li> <li>▪ sorveglianza sierologica</li> </ul>	Come i precedenti, inoltre: tuta protettiva, respiratore con filtri HEPA	Come i precedenti, inoltre: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ separazione fisica dal corridoio di accesso</li> <li>▪ doppia porta a chiusura automatica</li> <li>▪ assenza d'aria di ricircolo</li> <li>▪ pressione negativa all'interno del laboratorio</li> </ul>
<b>4</b>	Ad elevato rischio di trasmissibilità per aerosol, rischio elevato di morte o caratteristiche generali di infettività non note	Come i precedenti, inoltre: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ abbigliamento specifico</li> <li>▪ doccia all'uscita</li> <li>▪ decontaminazione di qualsiasi materiale in uscita</li> </ul>	Come i precedenti, inoltre: tuta pressurizzata	Come i precedenti, inoltre: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ edificio singolo o zona fisicamente isolata dal resto dell'edificio</li> <li>▪ impianto dedicato di ventilazione e decontaminazione dell'aria</li> <li>▪ altri equipaggiamenti specifici</li> </ul>

**Tabella 1**

Livello degli agenti biologici in base alla pericolosità e relative misure di sicurezza.

Tipo	Velocità frontale dell'aria	Schema di flusso	Livello ammesso di agenti biologici	Protezione del piano di lavoro dalla contaminazione
Classe I	0,4	Ingresso frontale; uscita superiore e posteriore attraverso un filtro HEPA	2,3	No
Classe II tipo A	0,4	70% di ricircolo attraverso un filtro HEPA; scarico attraverso un filtro HEPA	2,3	Si
Classe II tipo B	0,5	Nessun ricircolo; scarico attraverso filtro HEPA direttamente all'esterno dell'edificio	2,3	Si
Classe III	NA	Aria in ingresso attraverso filtro HEPA; scarico attraverso due filtri HEPA in serie	3,4	Si

**Tabella 2**

Classificazione delle cappe biologiche di sicurezza



Disinfettanti	Requisiti			Attività				Applicazioni					Altre caratteristiche				
	diluzione	Min. conc. (a) (ppm)	Tempo (b)	Batteri	Min. conc. (a) (ppm)	Min. conc. (a) (ppm)	Spore batteriche	Superfici di lavoro	Veterinaria	Grandi aree	Liquidi di scarico	Decontaminazione per vetreria	Stabilità diluizione (c)	Corrosivo	Inflam.abile	Irritante per la pelle	Irritante per gli occhi
Composti fenolici	1-5%	10	NE	●	●	(d)		●	●			●	●		●	●	●
Composti clorati	5000 ppm (a)	10	30	●	●	●	●	●	●	●		●	●		●	●	●
Alcool etilico	70-85%	10	NE	●	●	(d)		●	●			●		●		●	●
Alcool isopropilico	70-85%	10	NE	●	●	(d)		●	●			●		●		●	●
Iodofori	25-1600 ppm	10	30	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●
Glutaraldeide	2%	10	30	●	●	●	●					● (d)	●		●	●	●

NE non efficace

a cloro disponibile (candeggina diluita 1:10)

b tempo di contatto in minuti

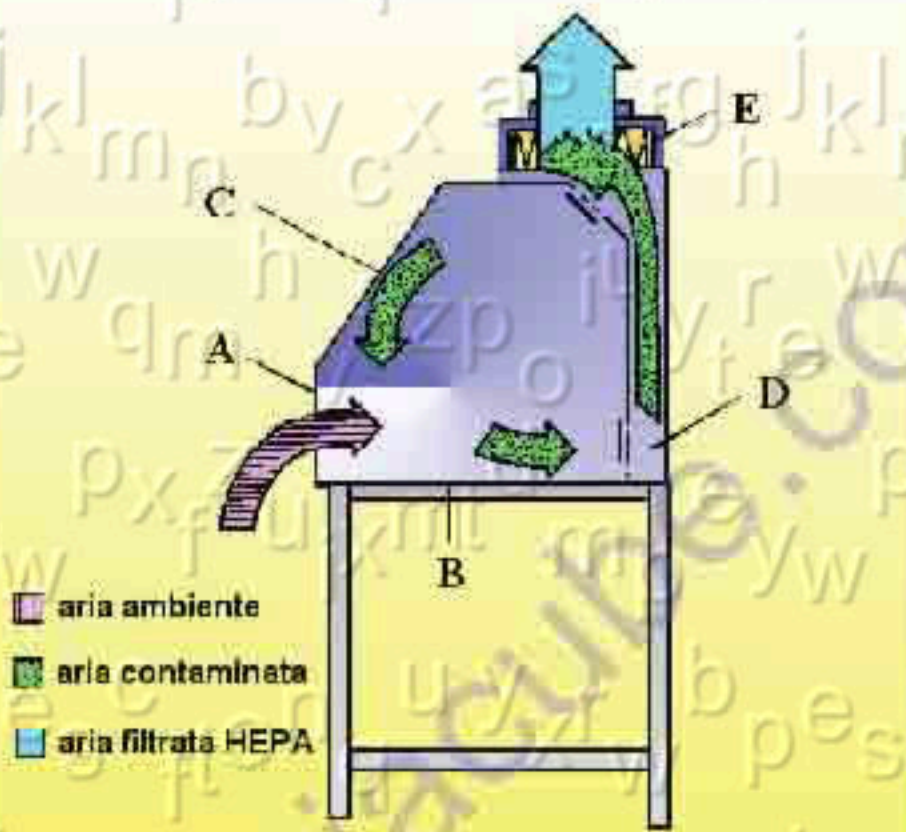
c risultati variabili a seconda del virus

d gas, infiammabile od esplosivo se usato impropriamente

e una settimana protetta da luce ed aria

**Tabella 3**

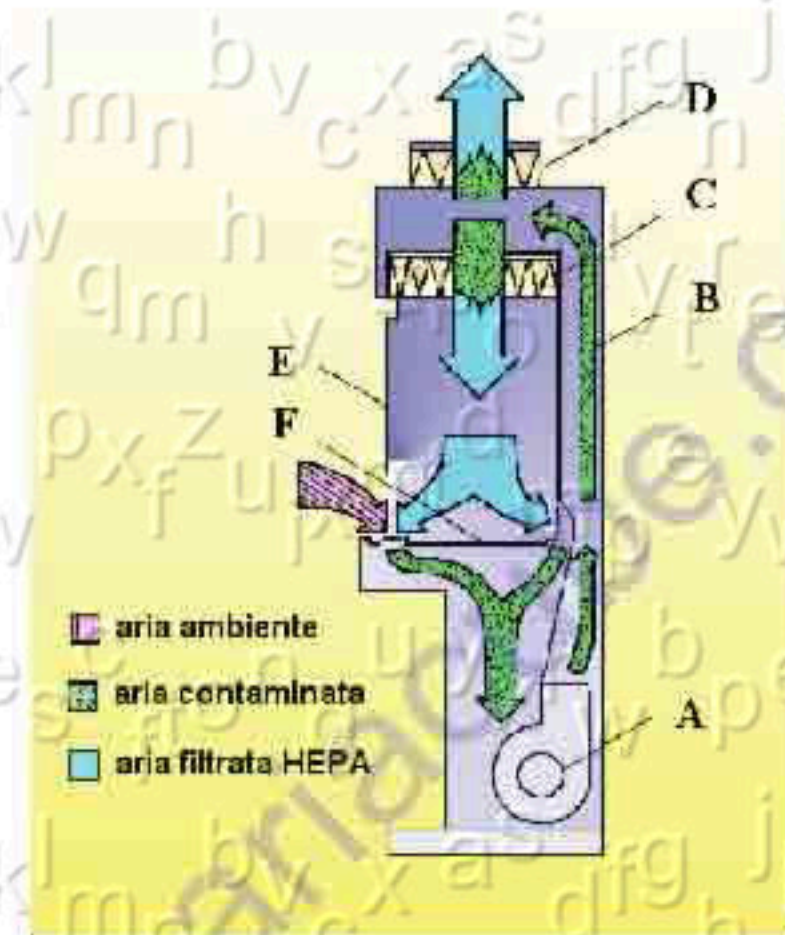
Disinfettanti utilizzabili nella decontaminazione da agenti biologici nella pratica di laboratorio.



**Figura 1**

*Cappa biologica di sicurezza di classe I*

A apertura frontale    B piano di lavoro    C finestra  
 D plenum di espulsione    E filtro HEPA



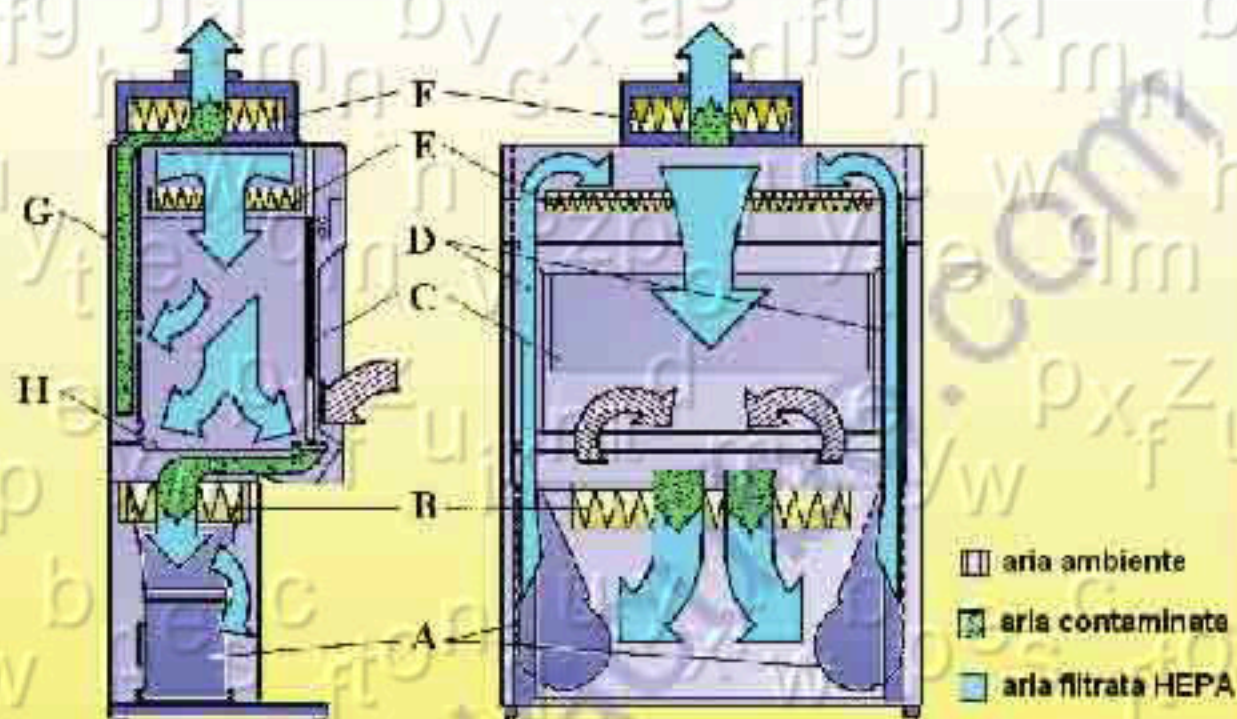
**Figura 2**

*Cappa biologica di sicurezza di classe II tipo A*

A ventilatore    B plenum posteriore

C filtro HEPA ingresso    D scarico

E finestra scorrevole    F piano di lavoro



**Figura 3**

*Cappa biologica di sicurezza di classe II tipo B*

A ventilatori

B filtri HEPA d'ingresso

C finestra scorrevole

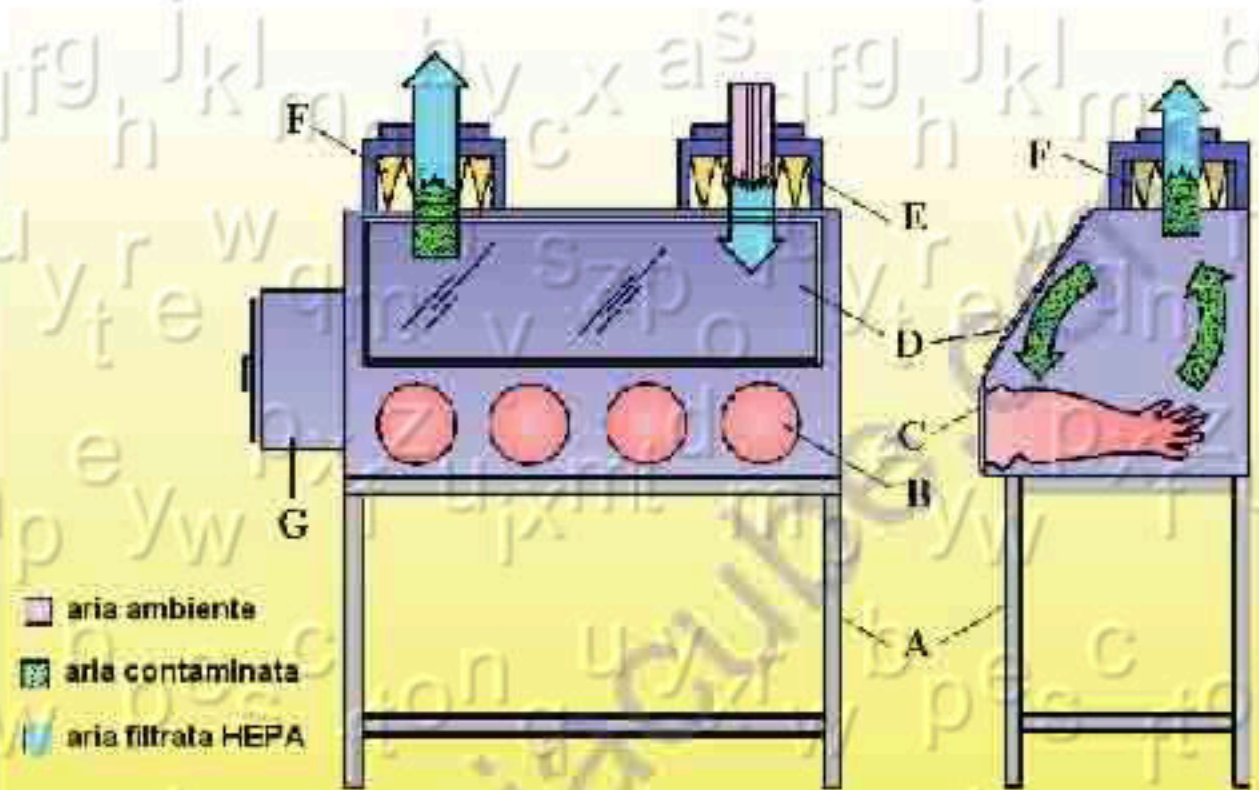
D plenum a pressione positiva

E filtro HEPA supplementare aria interna

F filtro HEPA scarico

G plenum di scarico a pressione negativa

H piano di lavoro



**Figura 4**

*Cappa biologica di sicurezza di classe III*

A supporto

B guanti in gomma

C o-ring di tenuta

D finestra a tenuta

E filtro HEPA ingresso

F filtro HEPA scarico

G autoclave a doppio ingresso

Nota: nelle cappe di classe III è necessario un secondo filtro HEPA di scarico in serie, qui non illustrato

**Siti di consultazione su Internet**

<http://www.tmc.tulane.edu/oehs/bmbl1993.htm>

"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", U.S. Department of Health and Human Services, 1993.

[http://www.oehs.upenn.edu/bio/rDNA/rDNA\\_Guidelines.html](http://www.oehs.upenn.edu/bio/rDNA/rDNA_Guidelines.html)

"Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (NIH Guidelines)", U.S. Department of Health and Human Services, 1996.

<http://quarton.evms.edu/radsafety/bsm.html>

"EVMS Biosafety Procedure Manual", Institutional Biosafety Committee (IBC) of the Eastern Virginia Medical School, 1998.