

6

Tecniche di laboratorio sicure

La maggior parte degli incidenti di laboratorio e delle infezioni che ne derivano sono causati da errori umani, tecniche di lavoro cattive o insufficienti e uso errato delle apparecchiature. Questa sezione fornisce un compendio di metodi tecnici che sono stati studiati proprio per evitare gli incidenti più frequenti derivanti da questi fattori. Il lettore faccia anche riferimento alle sezioni sulle regole pratiche, sulle apparecchiature e sull'addestramento. Ulteriori informazioni sono reperibili in altre fonti (5, 9, 10, 16, 17-20).

Tecniche per la manipolazione sicura dei campioni in laboratorio

La raccolta, il trasporto interno e la ricezione di campioni, se eseguiti impropriamente, presentano rischio di infezione per il personale coinvolto.

Contenitori per campioni

I contenitori per campioni possono essere di vetro o di plastica. Devono essere robusti e non devono avere perdite quando il tappo o il coperchio sono correttamente applicati. Non deve rimanere materiale all'esterno del contenitore.

I contenitori vanno correttamente etichettati per facilitarne l'identificazione nel laboratorio. E' bene riporre i contenitori in buste di plastica, le quali non vanno chiuse con punti metallici.

I moduli di richiesta campioni non vanno avvolti intorno ai contenitori, ma messi in buste separate, preferibilmente di plastica.

Alcune istituzioni richiedono che campioni sospetti di contenere patogeni del gruppo di rischio 3, o il virus dell'epatite B o dell'immunodeficienza umana vengano identificati sul contenitore e sul modulo di richiesta con una speciale etichetta di "pericolo di infezione".

Trasporto al laboratorio

Per evitare perdite o versamenti accidentali dovrebbero essere impiegati speciali contenitori secondari, come vassoi o scatole, dotati di supporti che mantengano il campione in posizione verticale. I contenitori

secondari possono essere di metallo o di plastica, ma dovrebbero essere autoclavabili o resistenti ai disinfettanti chimici, e vanno regolarmente decontaminati.

Ricezione di campioni

I laboratori che ricevono grandi quantità di campioni devono adibire una stanza o una zona determinata alla loro ricezione.

Apertura dei pacchi

Il personale che riceve i campioni e li toglie dagli imballaggi di spedizione deve essere informato dei potenziali rischi per la salute che l'operazione presenta, e deve cercare assistenza qualificata in caso di rotture o perdite dai contenitori. Devono essere disponibili disinfettanti.

Gli imballaggi dei campioni andrebbero aperti su vassoi. Qualsiasi campione porti un'etichetta di "pericolo di infezione" o sia stato ricevuto per corriere aereo o per posta aerea dovrebbe essere aperto in cappa di sicurezza biologica.

Tecniche per l'uso delle pipette e delle propipette

1. Si deve sempre usare una propipetta. Il pipettare a bocca deve essere proibito.
2. Tutte le pipette devono essere dotate di tamponcini di cotone per ridurre la contaminazione delle propipette
3. Non si deve mai soffiare aria in un liquido contenente agenti infettivi.
4. I materiali infetti non devono essere mescolati tramite aspirazione ed espulsione alternate da una stessa pipetta.
5. I liquidi non vanno espulsi a forza dalle pipette.
6. Per evitare dispersioni di materiale infetto per caduta accidentale di gocce dalla pipetta, si deve stendere sul piano di lavoro un panno o della carta assorbente imbevuti di disinfettante, da autoclavare dopo l'uso.
7. Le pipette a caduta sono da preferirsi alle altre, perché non richiedono l'espulsione dell'ultima goccia.
8. Le pipette contaminate vanno completamente immerse in disinfettante appropriato (pagine 54-57) contenuto in un contenitore infrangibile, e lasciate così per 18-24 ore prima dell'eliminazione.
9. Il contenitore per le pipette usate va posto dentro la cappa di sicurezza biologica, e non a lato di essa.
10. Le siringhe con aghi ipodermici non devono essere usate come propipette. Al posto degli aghi si devono usare cannule smussate. Esistono attrezzi per l'apertura delle bottiglie con tappo perforabile che evitano l'uso degli aghi ipodermici e delle siringhe.

Tecniche per evitare la dispersione di materiali infetti

1. L'anello delle anse deve essere completamente chiuso, e l'asta non essere più lunga di 6 cm.

2. Il rischio di schizzare materiale infetto deve essere evitato usando al posto del becco Bunsen un microinceneritore per sterilizzare l'ansa. Sono da preferirsi le anse monouso, che non necessitano di sterilizzazione.
3. I test della catalasi non vanno fatti su vetrino; si devono usare tecniche in provetta o con vetro di copertura. Una tecnica alternativa è di toccare la superficie di una colonia con un tubo da microematocrito riempito di perossido di idrogeno.
4. Le colture ed i campioni scartati da eliminare devono essere messi in contenitori a tenuta, come, ad es., sacchi per rifiuti di laboratorio dotati di appositi sostegni.
5. Alla fine di ciascuna sessione di lavoro, le aree di lavoro devono essere decontaminate con un disinfettante adatto.

Tecniche per l'uso delle cappe di sicurezza biologica

1. L'uso e i limiti delle cappe di sicurezza biologica (pag. 69) vanno spiegati a tutti i potenziali utenti, facendo riferimento agli standard nazionali e alla letteratura esistente in merito. Il personale deve avere a disposizione protocolli scritti. In particolare, deve essere chiaro che la cappa non protegge le mani dell'operatore da grossi versamenti, rotture o cattiva tecnica di lavoro.
2. La cappa non deve essere usata se non è perfettamente funzionante.
3. Quando la cappa è in uso, il pannello di chiusura in vetro non deve essere aperto.
4. Le attrezzature e i materiali nella cappa devono essere ridotti al minimo e posti in fondo all'area di lavoro.
5. Nella cappa non si devono usare becchi Bunsen. Il caldo prodotto causa scompensi nel flusso d'aria e può danneggiare i filtri. Si possono usare i microinceneritori, ma sono preferibili le anse monouso.
6. Tutte le operazioni devono essere eseguite nel mezzo o in fondo alla superficie di lavoro ed essere visibili dal pannello di vetro.
7. Il passaggio di cose e persone alle spalle dell'operatore deve essere ridotto al minimo.
8. L'operatore non deve disturbare il flusso d'aria introducendo e togliendo ripetutamente le braccia.
9. La ventola della cappa va lasciata in moto per almeno 5 minuti dopo la fine del lavoro.

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

Ulteriori informazioni sulle cappe di sicurezza biologica sono fornite nel capitolo 11. Vedere anche i riferimenti bibliografici 1, 5, 11 e 21-27.

Tecniche per evitare l'ingestione di materiali infetti e il loro contatto con la pelle e con gli occhi

1. Le particelle e le gocce più grandi ($>5 \mu\text{m}$) che cadono durante le manipolazioni microbiologiche si fermano rapidamente sulle superfici dei banconi e sulle mani dell'operatore. Le mani dovrebbero

essere lavate frequentemente. Gli operatori dovrebbero evitare di toccarsi la bocca e gli occhi.

2. Cibi e bevande non vanno consumati o conservati in laboratorio.
3. Nel laboratorio non deve essere consentito fumare né masticare gomma.
4. Non deve essere consentito truccarsi in laboratorio.
5. Viso e occhi vanno protetti durante qualsiasi operazione che possa causare schizzi di materiale infetto.

Tecniche per evitare l'inoculazione di materiali infetti

1. L'inoculazione può essere causata da incidenti con aghi ipodermici ("punture d'ago"), pipette Pasteur e vetri rotti.
2. Gli incidenti da puntura d'ago possono essere prevenuti solo (a) prestando particolare attenzione e (b) riducendo al minimo l'uso di siringhe e aghi; per molte tecniche possono essere impiegate siringhe con cannule smussate. Sono disponibili semplici attrezzi per l'apertura delle provette con tappo perforabile in modo da consentire l'uso delle pipette.
3. Le pipette Pasteur in vetro vanno sostituite con quelle in plastica morbida.
4. L'inoculazione accidentale tramite vetri rotti o sbeccati può essere evitata solo con l'attenzione personale.

Tecniche per la separazione dei sieri

1. Per questo lavoro deve essere impiegato solo personale appositamente addestrato.
2. Devono essere indossati i guanti.
3. Gli schizzi e gli aerosol possono essere prevenuti solo con una buona tecnica di lavoro. Il sangue e il siero devono essere pipettati con attenzione, non versati. Il pipettare a bocca va proibito.
4. Le pipette usate vanno immerse in ipoclorito o altro disinfettante adatto, e devono restarvi immerse almeno una notte prima di essere eliminate o decontaminate per riutilizzarle.
5. Le provette di campioni scartati che contengono coaguli di sangue, ecc. (alle quali vanno sostituiti i tappi), devono essere poste in contenitori adatti a prova di perdita per essere autoclavate e incenerite.
6. Deve essere disponibile la soluzione di ipoclorito, preparata quotidianamente, per pulire schizzi e versamenti di sangue e siero (vedere capitolo 9).

Tecniche per l'uso delle centrifughe

Linee generali

1. Il requisito fondamentale per la sicurezza microbiologica nell'uso delle centrifughe di laboratorio è un funzionamento soddisfacente della meccanica.

2. Le centrifughe devono essere usate seguendo le istruzioni del fabbricante.
3. Le centrifughe vanno messe ad altezza tale da permettere a operatori più bassi della media di vedere l'interno per inserire correttamente gli accessori e i contenitori.
4. I rotori e i contenitori delle centrifughe vanno ispezionati quotidianamente per accertare l'assenza di corrosioni e di fessure capillari.
5. I contenitori e gli accessori da centrifuga devono essere appaiati per peso e, con le provette nella loro sede, essere appropriatamente bilanciati.
6. Per bilanciare i contenitori si deve usare alcool (propanolo al 70%). Le soluzioni saline o di ipoclorito non vanno usate perché entrambe corrodono i metalli.
7. Dopo l'uso, i contenitori vanno riposti capovolti per fare asciugare il fluido di bilanciamento.
8. Durante l'uso della centrifuga possono fuoriuscire nell'aria particelle infette, che viaggiano a velocità troppo elevata per venire trattenute se la centrifuga è in una cappa di sicurezza biologica classe I o classe II convenzionale.
9. Una buona tecnica nell'uso della centrifuga, provette tappate in modo sicuro e contenitori per centrifuga a tenuta ("contenitori di sicurezza") offrono protezione adeguata contro aerosol infetti e dispersione di particelle contenenti organismi dei gruppi di rischio 2, 3 e 4.

Per ulteriori informazioni sull'uso sicuro delle centrifughe, vedere i riferimenti bibliografici 28 e 29.

Centrifugazione di microorganismi e materiali del gruppo di rischio 2

1. Le provette da centrifuga e i contenitori dei campioni devono essere di vetro a pareti spesse o di plastica e se ne deve verificare l'integrità prima dell'uso.
2. Le provette e i contenitori dei campioni devono essere sempre chiusi in modo sicuro.
3. L'interno della centrifuga va ispezionato ogni giorno per verificare l'assenza di tracce di ruggine o corrosione all'altezza del rotore. Nel caso se ne dovessero trovare, i protocolli di centrifugazione devono essere rivisti.
4. Per lavori microbiologici non si devono mai usare testate angolari eccetto che in centrifughe speciali ad alta velocità. Con le testate angolari normali, a causa della forma della macchina, possono fuoriuscire liquidi persino dalle provette chiuse.
5. Fra il livello del liquido e il bordo della provetta devono essere lasciati almeno 2 cm, eccetto che nelle ultracentrifughe e nelle provette piccole per protrombina.

Centrifugazione di microorganismi e materiali dei gruppi di rischio 3 e 4

1. Materiali che potrebbero contenere microorganismi dei gruppi di rischio 3 e 4 devono essere centrifugati separatamente dagli altri materiali.
2. Le provette e i provettoni per centrifuga devono avere tappi a vite ed essere contrassegnati secondo un codice stabilito localmente che indichi che il loro contenuto è nel gruppo di rischio 3 o 4.
3. Devono essere utilizzati contenitori per centrifuga a tenuta (contenitori di sicurezza).
4. I contenitori devono essere riempiti, chiusi e aperti in cappa di sicurezza biologica.
5. I contenitori, i rotori e l'interno delle centrifughe vanno decontaminati regolarmente.

Tecniche per l'uso di omogenizzatori, agitatori e sonicatori

1. Gli omogenizzatori domestici da cucina non vanno usati in laboratorio perché possono causare perdite e creare aerosol. I miscelatori e gli "stomacher" da laboratorio sono più sicuri (Fig. 5 e 6).
2. I tappi e i contenitori devono essere in buone condizioni e privi di imperfezioni o distorsioni. I tappi devono adattarsi perfettamente e le guarnizioni essere in buono stato.

Fig. 5. Miscelatore di tipo Waring per la miscelazione sicura di materiali infetti
Fonte: Christison Scientific Equipment Ltd, Gateshead, England

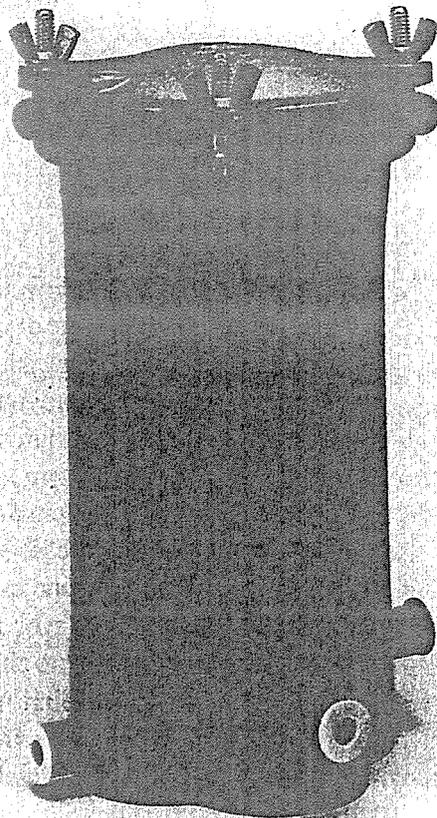
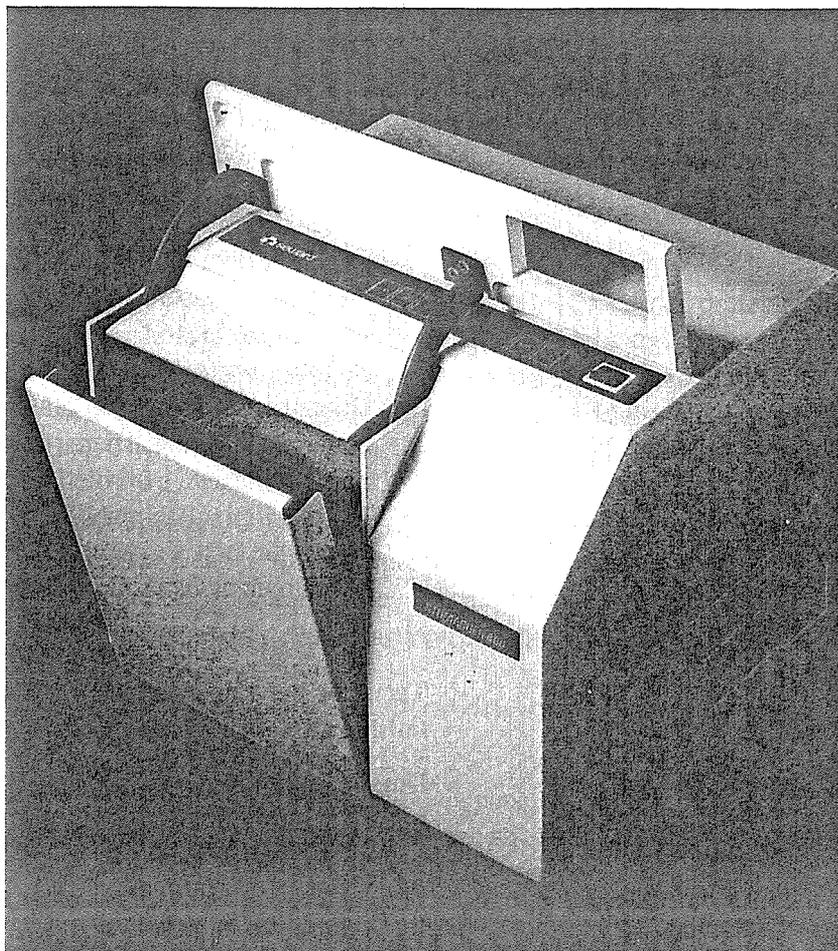


Fig. 6. "Stomacher" per mescolare materiali pericolosi
 Fonte: Seward Medical, London, England



3. Aerosol contenenti materiale infetto possono fuoriuscire fra il contenitore e il coperchio di omogenizzatori, agitatori e sonicatori, perché durante l'uso si forma una certa pressione al loro interno. Sono preferibili contenitori in politetrafluoroetilene (PTFE) anziché il vetro che potrebbe rompersi, liberando materiale infetto o addirittura causando il ferimento dell'operatore.
4. Durante l'uso questi apparecchi vanno coperti con una robusta custodia in plastica trasparente, da disinfettare dopo l'uso. Se possibile, gli apparecchi, coperti dalla loro custodia, andrebbero usati in cappa di sicurezza biologica.
5. Alla fine dell'operazione il contenitore va aperto in cappa di sicurezza biologica.
6. Protezioni acustiche devono essere a disposizione di chi utilizzi i sonicatori.

Tecniche per l'uso di frantumatori di tessuti (provette di Griffith, frantumatori di TenBroek)

1. I frantumatori in vetro dovrebbero essere avvolti in materiale assorbente e usati indossando i guanti. I frantumatori in PTFE sono più sicuri.
2. I frantumatori di tessuti vanno utilizzati ed aperti in cappa di sicurezza biologica.

Tecniche per la manutenzione e l'uso di frigoriferi e congelatori

1. I frigoriferi, i congelatori e le ghiacciaie a ghiaccio secco devono essere periodicamente scongelati e puliti, e le fiale, le provette ecc. che possano essersi rotte durante la conservazione devono essere rimosse. Durante il lavoro di pulizia si devono indossare una protezione per il viso e guanti di gomma pesante. Dopo la pulizia, la superficie interna dell'apparecchiatura deve essere disinfettata.
2. Su tutti i contenitori conservati nei frigoriferi ecc., deve essere chiaramente apposta un'etichetta con il nome scientifico dei materiali contenuti, il nome di chi li ha riposti e la data. I materiali privi di etichetta e obsoleti dovrebbero essere autoclavati.
3. Le soluzioni infiammabili non vanno conservate in frigorifero a meno che non sia a prova di esplosione. In questo caso, va apposto un avviso sulle porte del frigorifero.

Tecniche per l'apertura di fiale contenenti materiali infetti liofilizzati

Durante l'apertura di fiale contenenti materiali liofilizzati si deve prestare attenzione perché il contenuto può essere ad una pressione bassa e l'improvviso ingresso d'aria nella fiala potrebbe disperderne parte nell'atmosfera. Le fiale vanno sempre aperte in cappa di sicurezza biologica.

Per l'apertura delle fiale si raccomanda la seguente procedura:

1. Innanzitutto decontaminare la superficie esterna della fiala.
2. Intaccare quindi la fiala più o meno a metà del tampone di ovatta o di cellulosa.
3. Tenere la fiala con un tampone di cotone per proteggere le mani.
4. Appoggiare all'intaccatura un ferro incandescente per rompere il vetro.
5. Rimuovere delicatamente la parte superiore, trattandola come materiale infetto.
6. Se il tampone di cotone è ancora sopra il contenuto della fiala, rimuoverlo con pinze sterili.
7. Aggiungere lentamente il liquido di risospensione per evitare il formarsi di schiuma.

Conservazione di fiale contenenti materiali infetti

Le fiale contenenti materiali infetti non vanno mai immerse in azoto liquido perché se rovinata o mal sigillata possono esplodere quando vengono rimosse. Se sono necessarie basse temperature, le fiale vanno conservate solo nella fase gassosa al di sopra dell'azoto liquido. Altrimenti, i materiali infetti vanno conservati in congelatori o in anidride carbonica solida (ghiaccio secco).

Il personale deve indossare protezioni per gli occhi e per le mani quando rimuove le fiale dal luogo di conservazione e refrigerazione.

Le superfici esterne delle fiale così conservate devono essere disinfettate quando le si rimuove dal luogo di conservazione.

Speciali precauzioni nel trattamento di sangue e altri fluidi corporei

Le precauzioni di seguito riportate sono studiate per proteggere il personale da infezioni da patogeni trasmessi dal sangue, come il virus dell'epatite B, il virus dell'immunodeficienza umana, e il virus delle febbri emorragiche, e quelli portati da protozoi ed elminti (2, 5, 18, 30-34).

Nota. I pazienti sospetti di essere affetti da febbre emorragica possono in realtà avere la malaria, perciò prima di tentare qualsiasi altra procedura di laboratorio si deve esaminare uno striscio di sangue per cercare i parassiti della malaria (vedi "strisci di sangue", pag. 42).

Raccolta, etichettatura e trasporto dei campioni

1. Durante l'intera operazione si devono indossare i guanti.
2. Il prelievo deve essere fatto da personale esperto.
3. Dopo la puntura endovenosa, gli aghi vanno rimossi dalle siringhe con pinze sterili e posti in speciali contenitori. Il sangue va messo con attenzione in una provetta e la siringa gettata in un contenitore speciale. La provetta va quindi chiusa in modo sicuro.
4. Le provette contenenti i campioni e i moduli di richiesta devono essere contrassegnati con un segnale di "Pericolo di infezione" o con avvisi simili o più specifici.
5. Le provette vanno poste in sacchi di plastica per essere inviate al laboratorio. I moduli di richiesta vanno messi in buste separate.
6. Il personale addetto alla ricezione non deve aprire questi sacchi.

Contenimento

1. Il lavoro diagnostico può essere svolto in un laboratorio di base -livello di biosicurezza 2, preferibilmente adibito esclusivamente a questo scopo.
2. Il lavoro di ricerca e sviluppo che implichi la propagazione o la concentrazione dei microorganismi dovrebbe essere svolto in un laboratorio di sicurezza - livello di biosicurezza 3.

Apertura dei contenitori e dei campioni

1. Le provette dei campioni devono essere aperte in una cappa di sicurezza biologica classe I o classe II.
2. Si devono indossare i guanti.
3. Per prevenire schizzi, il tappo deve essere preso saldamente fra le dita dopo averlo avvolto in un pezzo di carta.

Indumenti protettivi

Agli indumenti protettivi si devono aggiungere un grembiule di plastica, guanti e occhiali di sicurezza o un visore.

Vetro e oggetti taglienti o acuminati

1. Quando possibile, la plastica è da preferirsi al vetro. Si deve usare solo vetro robusto (borosilicato), e ogni oggetto che sia sbeccato o incrinato va eliminato.
2. Non devono essere utilizzati aghi ipodermici. Sono permesse le cannule.
3. Bisturi e coltelli non devono essere utilizzati su tessuti non fissati.

Strisci di sangue

I vetrini di campioni di sangue andrebbero manipolati con le pinze. Strisci spessi, asciugati ad aria provenienti da pazienti sospetti di essere affetti da febbre emorragica virale dovrebbero essere esposti per 15 minuti ad una soluzione tamponata di formalina (formalina, 380 g/l, 500 ml; diidrogeno sodico fosfato monoidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 22,75 g; idrogeno fosfato disodico anidro (Na_2HPO_4), 32,5 g; acqua distillata, 4500 ml), quindi risciacquati abbondantemente con acqua corrente prima della colorazione. Gli strisci sottili dovrebbero essere fissati in metanolo per 30 minuti, quindi scaldati a 95°C (2).

Nota. Altri agenti possono ancora essere accettabili.

Attrezzature automatizzate

1. Le attrezzature dovrebbero essere di tipo chiuso.
2. Le sonde dovrebbero essere schermate per evitare schizzi ed incidenti da puntura d'ago.
3. I liquidi di scarico vanno raccolti in recipienti chiusi o eliminati attraverso lo scarico scendendo ad almeno 25 cm di profondità.
4. Non c'è bisogno di utilizzare apparecchiature apposite se i campioni vengono "raggruppati" e saggiati insieme alla fine della sessione.
5. Se la natura dell'attrezzatura lo permette, è bene far passare attraverso di essa ipoclorito o glutaraldeide alla fine di ogni sessione di lavoro. Altrimenti, sciacquare con acqua può essere sufficiente.

Centrifugazione

1. Tutte le provette da centrifuga vanno tappate.
2. Si devono usare contenitori a tenuta (contenitori di sicurezza).

Tessuti

1. Si devono utilizzare fissativi alla formalina. Piccoli campioni quali quelli provenienti da aghi per biopsie possono essere fissati e decontaminati in poche ore, ma per campioni più grandi possono essere necessari molti giorni.

2. Si dovrebbe evitare di sezionare materiali congelati. Se è assolutamente necessario farlo, allora il criostato deve essere schermato e l'operatore deve indossare un visore. In seguito la temperatura dello strumento deve essere portata a 20°C affinché si possa decontaminarlo.

Decontaminazione

Per la decontaminazione si raccomandano gli ipocloriti e le aldeidi. Gli ipocloriti dovrebbero contenere 1 g/litro di cloro disponibile per uso generico e 10 g/litro per versamenti di sangue. L'aldeide glutarica può essere usata per decontaminare le superfici (vedi nota a pag. 56).

Precauzioni nel trattamento di materiali che possono contenere agenti "non convenzionali"

Gli agenti non convenzionali - prioni o "lenti virus" - sono associati a certe encefalopatie trasmissibili, in particolare la malattia di Creutzfeldt-Jakob, la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) ed il kuru negli umani; lo "scrapie" nelle pecore e nelle capre; l'encefalopatia spongiforme nei bovini; ed altre encefalopatie contagiose dei cervi, delle alci e dei mustelidi.

Sebbene la malattia di Creutzfeldt-Jakob sia stata trasmessa ad umani, non esistono casi provati di infezioni da laboratorio per nessuno di questi agenti. Ciononostante, è prudente osservare certe precauzioni nel manipolare materiali prelevati da individui o animali infetti o potenzialmente tali.

Il materiale deve essere manipolato in condizioni di livello di biosicurezza 2 con le seguenti precauzioni aggiuntive, dal momento che questi agenti non vengono uccisi dalle normali procedure di laboratorio di disinfezione e sterilizzazione.

1. Si devono indossare i guanti e una protezione per gli occhi.
2. Ogni manipolazione va condotta in cappa di sicurezza biologica.
3. Bisogna esercitare grande cautela nell'evitare produzione di aerosol, tagli e punture della pelle.
4. I tessuti fissati con formalina vanno considerati come ancora infetti, persino dopo un'esposizione prolungata.
5. Non si devono usare processori di tessuti per problemi di decontaminazione. Vanno invece usati matracci e beker.
6. Tutti i matracci, i beker, i materiali da lavare, la cera per inclusione, gli strumenti, ecc. dovrebbero essere raccolti per la decontaminazione.
7. Questi materiali dovrebbero essere autoclavati a 134°C per 18 minuti (vedere pag. 62 per soluzioni alternative).
8. Gli strumenti che non vanno in autoclave vanno immersi in una soluzione di ipoclorito con 10 g/litro di cloro disponibile, e lasciati per almeno 18 ore.
9. Le superfici da decontaminare vanno bagnate con ipoclorito, 10 g/litro di cloro disponibile, per almeno 30 minuti.

Per ulteriori informazioni riguardo alla manipolazione di agenti non convenzionali, vedi i riferimenti bibliografici 2, 5 e 35.