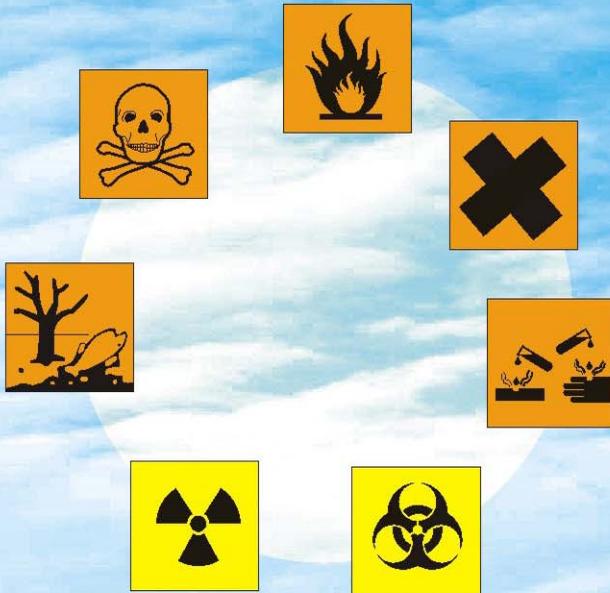




Manuale di sicurezza per il personale dei laboratori di ricerca biotecnologica



*A cura di
Dimitri Sossai, Mariangela Miele, Paola Bet*

Manuali

Tutti i diritti riservati

ISBN 88-8163-280-2

Finito di stampare nel mese di agosto 2001
nello stabilimento litografico della

Erga  **edizioni**

Via Biga 52 (canc.) - 16144 Genova
Tel. 010 83.28.441 - Fax. 010 83.28.799
www.erga.it - edizioni@erga.it

Manuale di sicurezza per il personale dei laboratori di ricerca biotecnologica



*A cura di:
Dimitri Sossai, Mariangela Miele, Paola Bet*

Questo volume è stato realizzato con il contributo della Comunità Europea – Direzione Generale Lavoro e Affari Sociali.

A cura di: Dimitri Sossai, Mariangela Miele, Paola Bet.

Gli autori desiderano ringraziare per il prezioso contributo alla realizzazione di questo manuale Luisa Albinelli, Maria Giuseppina Campi, Michele Cilli, Chiara Colagiacomò, Milvia Formentera, Jennifer Mc Dermott, Cecilia Melani, Romina Piccolo, Paolo Romano.

Autori e affiliazioni

Paola Bet *
Marcel Castegnaro
Francesca Cavalli °
Modesto Roman Delgado ☆
Silvia Franchello
Bernardetta Ledda *
Ubaldo Leoncini ○
Mariangela Miele ◆
Rosa Montero Simò ☆
Bruno Papaleo ♥
André Picot ❀
Stefano Signorini ♥
Dimitri Sossai ❀
Paola Tomao ♥
Cinzia Lucia Ursini ♥
Nicoletta Vonesch ♥

- * Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST), Genova - Italia
- ☆ Centro de Seguridad e Higiene en el Trabajo, CSHT, Consejera de Empleo y Desarrollo Tecnológico, Junta de Andalucía - Cordoba - España.
- ♥ Istituto Superiore Prevenzione e Sicurezza del Lavoro (ISPESL), Roma - Italia.
- ❀ Unité de Prévention du risque Chimique CNRS, Gif sur Yvette - France.
- ❀ Azienda Ospedaliera San Martino di Genova e Cliniche Universitarie Convenzionate, Genova – Italia
- ° Consorzio Interuniversitario per la Biologia Molecolare delle Piante (CIBMP), Genova – Italia
- Azienda USL 3 Genovese, Genova - Italia

INDICE

	pag.
PREFAZIONE	9
VALUTAZIONE DEL RISCHIO	11
RISCHIO BIOLOGICO	19
AGENTI BIOLOGICI	19
<i>Bibliografia</i>	26
VALUTAZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO	28
<i>Bibliografia</i>	35
PREVENZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO	37
<i>Bibliografia</i>	53
CONTAMINAZIONE ACCIDENTALE CON AGENTI BIOLOGICI	54
<i>Bibliografia</i>	58
SPEDIZIONE DI MATERIALI BIOLOGICI DEPERIBILI E/O POTENZIALMENTE INFETTI	59
<i>Bibliografia</i>	61
SPERIMENTAZIONE ANIMALE	63
<i>Bibliografia</i>	75
RISCHIO CHIMICO	77
SOSTANZE CHIMICHE NEI LABORATORI DI BIOTECNOLOGIA	77
IMPIEGO DEI COMPOSTI GENOTOSSICI, MUTAGENI E CANCEROGENI	116
<i>Bibliografia</i>	128
CONTAMINAZIONI ACCIDENTALI CON SOSTANZE CHIMICHE CANCEROGENE E PROCEDURE DI EMERGENZA	132

RISCHIO RADIOLOGICO	139
<i>Bibliografia</i>	<i>145</i>
<i>Schede tecniche</i>	<i>147</i>
LA SORVEGLIANZA SANITARIA DEI LAVORATORI	165
<i>Bibliografia</i>	<i>188</i>
PRECAUZIONI PER L'USO DI AGENTI BIOLOGICI E CHIMICI.....	189
<i>Bibliografia</i>	<i>203</i>
ALLEGATO I.....	205
ALLEGATO II	219
LEGISLAZIONE EUROPEA.....	219
LEGISLAZIONE ITALIANA	226

PREFAZIONE

Migliorare la sicurezza sui luoghi di lavoro deve essere un obiettivo centrale in qualunque paese, e a maggior ragione in quelli più industrializzati, la categoria a cui tutta l'Europa appartiene. Nella storia recente, l'impatto sociale della carenza di sicurezza è stato impressionante: basti pensare alle migliaia di incidenti mortali sul lavoro nell'edilizia civile da quando si costruiscono ponti, tunnel e ferrovie; alle migliaia di lavoratori periti per silicosi nella prima metà del XX secolo; agli innumerevoli disastri minerari in tutto il mondo. Si potrebbe pensare che questa sia storia passata; ma basta ricordare la tragedia della diossina a Seveso (1976) o quella del metilisocianato a Bhopal (1984) per ravvedersi.

Al confronto, la sicurezza nei laboratori biologici potrebbe sembrare una questione di dettaglio. La questione è invece importante per vari motivi. In primo luogo, l'industria biotecnologica è giovane rispetto a quelle più tradizionali, ad esempio l'industria meccanica e chimica: pertanto anche la comprensione dei problemi della sicurezza è basata su meno esperienza, e ciò impone cautela. In secondo luogo, i rischi sono qualitativamente diversi da quelli degli ambienti industriali più tradizionali. Dopo 25 anni di ingegneria genetica possiamo dire che per fortuna i paventati incidenti, o "bombe biologiche", non sono esplose: ma è innegabile che operazioni che modificano il genoma di qualsiasi organismo ispirano sentimenti di preoccupazione che non possiamo ignorare. Si potrebbe dire che il bioterrorismo sta alla microbiologia come una bomba termonucleare sta alla fisica: ma forse, ancor più che nel caso della fisica, il pubblico è preoccupato di eventuali incidenti.

Passando ai laboratori di ricerca, esiste poi un terzo motivo. Teoricamente, sono proprio i ricercatori che potrebbero generare nuovi problemi: e allora quis custodiet custodes? E' doppiamente importante che i ricercatori si dimostrino attivamente solleciti a proteggere il pub-

blico e se stessi nel corso della sperimentazione.

La prima esplicita espressione delle preoccupazioni in merito data alla pubblicazione nel 1976, negli Stati Uniti, dopo la famosa conferenza di Asilomar, del primo documento di biosicurezza finalizzato alla prevenzione del rischio presente nei laboratori di ricerca biologica.

Per tutti questi motivi, questo libro è importante e tempestivo. Esso nasce dalla collaborazione tra persone che operano nel mondo della ricerca e persone che si occupano di prevenzione a tutti i livelli della sanità pubblica. Tenendo conto delle recenti normative europee sulla sicurezza, questo volume vuole essere una guida pratica per la sicurezza chimica, fisica e biologica dei ricercatori che operano nel campo delle biotecnologie, compreso l'uso di microorganismi geneticamente modificati.

Gli autori hanno sviluppato le loro esperienze professionali presso importanti centri europei di ricerca e di cura come l'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST - Genova), l'International Agency for Research on Cancer (IARC - Lyon), l'Istituto Superiore Per la Sicurezza del Lavoro (ISPESL - Roma), l'Azienda Ospedaliera San Martino di Genova e Cliniche Universitarie Convenzionate (Genova), il Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRS- Gif sur Yvette), il Centro de Seguridad e Higiene en el Trabajo, CSHT, Consejeria de Empleo y Desarrollo Tecnológico, Junta de Andalucía, (Cordoba España) e il Consorzio Interuniversitario Biologia Molecolare Piante (CIBMP-Genova). Sono lieto che il libro sia nato qui, e mi auguro che possa veramente risultare un utile strumento di lavoro per la salvaguardia della salute dei lavoratori, della qualità del lavoro e dell'ambiente.

Prof. Lucio Luzzatto

Direttore Scientifico

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro - Genova

VALUTAZIONE DEL RISCHIO

Dimitri Sossai, Ubaldo Leoncini, Paola Bet, Mariangela Miele

Il personale che lavora nei laboratori di ricerca è esposto ad un rischio professionale che frequentemente è sottovalutato dai diretti interessati i quali, spesso, prendono coscienza dell'esistenza di tale rischio solo quando accadono incidenti gravi; generalmente il rischio nei laboratori è "invisibile", quindi maggiormente pericoloso rispetto ad altre attività lavorative. Ne consegue che, la pericolosità degli agenti utilizzati, l'adeguatezza dei dispositivi di protezione e le condizioni delle attrezzature non dovrebbero essere valutati separatamente, ma come facenti parte di un'unica procedura. Tutti i fattori di rischio che concorrono ad una determinata attività dovrebbero essere identificati al fine di definire procedure standard per limitare, quanto più possibile, il rischio correlato a tale attività.

Il **rischio** è definito come la probabilità che una sostanza, un oggetto o una situazione possa creare pericolo in condizioni specifiche.

Il **pericolo** è una fonte o una situazione che può creare un potenziale danno alla salute, all'ambiente o ad entrambi.

Il rischio è generalmente considerato come la combinazione di due fattori:

- la probabilità che un incidente o evento avverso si verifichi
- la conseguenza dell'incidente (danno)

Per **incidente** si intende un evento non pianificato che ha la potenzialità di produrre un danno alla salute, all'ambiente o ad entrambi.

La formula che definisce il rischio è la seguente:

$$\mathbf{R} \text{ (rischio)} = \mathbf{P} \text{ (probabilità)} \times \mathbf{D} \text{ (danno)}$$

La **valutazione del rischio** è il processo complessivo di stima dell'entità del rischio e di decisione se un rischio sia o meno tollerabile od accettabile.

Per la valutazione del rischio devono essere considerati i seguenti elementi:

- caratteristiche del pericolo e/o della sua sorgente
- identificazione del bersaglio e della sua importanza
- natura del danno
- vulnerabilità del bersaglio
- caratterizzazione della via di trasmissione del pericolo dalla sorgente al bersaglio

La valutazione del rischio consiste quindi nel processo di riconoscimento del tipo di pericolo esistente, della quantificazione della gravità del danno prodotto da tale pericolo e della probabilità che un determinato evento dannoso si verifichi. Il processo di riconoscimento del pericolo e, di conseguenza, la valutazione del rischio non sono azioni semplici. A tal riguardo si suggerisce l'utilizzo della **matrice di rischio** che nasce proprio come strumento per l'analisi dei rischi (Ozog, 1985, Code of Federal Regulation, 1986). La matrice di rischio è una semplificazione delle curve iso-rischio nel piano dato probabilità/danno (P, D); le coordinate (P, D) individuano giudizi sulla situazione in esame.

Nel caso specifico in cui si valuti il rischio presente nei laboratori, si suggerisce l'utilizzo di una matrice che prende in considerazione tre livelli di probabilità e tre livelli di gravità del danno (fig. 1). In tabella I sono riportate, a titolo di esempio, alcune considerazioni rispetto alla frequenza degli incidenti, all'ambiente di lavoro e alla salute del lavoratore, che possono essere utili ai fini di identificare la probabilità che un determinato evento dannoso si verifichi.

Tabella I. Valore della Probabilità in diverse situazioni

PROBABILITA'	FREQUENZA DEGLI INCIDENTI	ASPETTI DI SICUREZZA RELATIVI ALL'ORGANIZZAZIONE E ALLA GESTIONE NELL'AMBIENTE DI LAVORO	ASPETTI DI SICUREZZA RELATIVI ALLA SALUTE DEI LAVORATORI
Improbabile	<ul style="list-style-type: none"> - Non sono noti incidenti o si sono verificati con frequenza bassissima. - Il verificarsi di un incidente suscita grande sorpresa. - Un incidente può generarsi dalla concomitanza di almeno due eventi indipendenti poco probabili. 	<ul style="list-style-type: none"> - Sicurezza elettrica: presenza di connessioni, dispersione a terra, distanza e/o adeguato isolamento della parte elettrica dall'acqua. - Fuoco: esistenza di precauzioni generali, buona installazione e manutenzione delle apparecchiature, procedure di emergenza chiare, sistemi di estinzione passiva, corretto addestramento degli operatori, adeguate procedure e presenza di vie di fuga. - Agenti chimici: assenza di reattività con acqua e/o con solventi. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agenti chimici: esposizione occasionale a concentrazioni inferiori del 25% rispetto al TLV-TWA*, non sono note azioni irritanti. - Radiazioni non ionizzanti: esposizione saltuaria a bassissime dosi. - Radiazioni ionizzanti: esposizione saltuaria a bassissime dosi - Agenti biologici: bassa o sconosciuta trasmissibilità per l'uomo. - Allergeni: esposizione saltuaria. - Identificazione e corretta gestione di depositi di agenti biologici pericolosi e di composti radiochimici.
Possibile	<ul style="list-style-type: none"> - È noto qualche episodio in cui si è verificato un incidente. - Il verificarsi di un incidente suscita moderata sorpresa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presenza di apparecchiature con generazione di calore; apparecchiature che necessitano di decontaminazione; solventi usati e conservati in modo inadeguato, sostanze infiammabili in congelatori. - Agenti chimici: presenza di corrosivi, irritanti, reazioni di effervescenza con acqua, generazione di calore, reazione a solventi volatili, possibilità di intossicazione. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agenti chimici (cancerogeni, teratogeni, mutageni): poliesposizione discontinua a livelli intorno al TLV-TWA*; possibilità di disseminazione di polveri ed aerosol. - Radiazioni non ionizzanti: esposizione abituale. - Radiazioni ionizzanti: esposizione abituale a dosi controllate. - Agenti biologici: media trasmissibilità, specificità dell'ospite, infettività tramite vettore. - Allergeni: esposizione abituale.

segue Tabella I

PROBABILITA'	FREQUENZA DEGLI INCIDENTI	ASPETTI DI SICUREZZA RELATIVI ALL'ORGANIZZAZIONE E ALLA GESTIONE NELL'AMBIENTE DI LAVORO	ASPETTI DI SICUREZZA RELATIVI ALLA SALUTE DEI LAVORATORI
Probabile	<ul style="list-style-type: none"> - Si sono già verificati incidenti. - Il verificarsi di un incidente non suscita alcuna sorpresa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presenza di apparecchiature vecchie senza regolare manutenzione; assenza di protezione delle parti elettriche dell'acqua. - Agenti chimici: reazione con solventi e generazione di miscele esplosive. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agenti chimici: poliesposizione abituale a concentrazioni normalmente superiori al TLV-TWA*. - Radiazioni non ionizzanti: esposizione abituale ad alte dosi. - Radiazioni ionizzanti: possibilità di inalazione, disseminazione. - Agenti biologici: elevata trasmissibilità, stabilità.

* TLV: Threshold Limit Value

TWA: Time-weighted average

TLV/TWA: valore limite di esposizione basato sulle 8 ore lavorative per 5 giorni alla settimana.

Il valore P viene associato ad un **Indice di Probabilità (IP)** nel modo seguente:

Improbabile	IP=1
Possibile	IP=2
Probabile	IP=3

Qualora esistano dubbi sul numero da associare alla P calcolata si suggerisce di scegliere il valore più alto.

In tabella II sono riportati, a titolo di esempio, l'effetto e la durata dell'esposizione, che possono essere utili ai fini di identificare la gravità del Danno.

Tabella II. Valore del Danno associato all'effetto e alla durata dell'esposizione.

DANNO	EFFETTO (DURATA)
Lieve	- esposizione acuta con invalidità temporanea (pochi giorni) - esposizione cronica con effetti omeostatici (stress psicofisico) - infortunio con inabilità temporanea
Grave	- esposizione acuta con effetti gravi - esposizione cronica con effetti reversibili e/o parzialmente invalidanti - infortunio con inabilità permanente
Gravissimo	- esposizione acuta con effetti letali o gravemente invalidanti - esposizione cronica con effetti irreversibili

La gravità del danno viene associata ad un **Indice di Danno (ID)** nel modo seguente:

Lieve	ID=1
Grave	ID=2
Gavissimo	ID=3

L'analisi dell'indice di Probabilità e dell'indice di Danno può portare a calcolare l'**Indice di Criticità**.

L'Indice di Criticità può essere calcolato per ogni tipologia di rischio e permette di definire le misure di prevenzione da adottare per ridurre o comunque controllare il rischio.

L'Indice di Criticità può essere calcolato con la seguente formula:

$$\mathbf{Indice\ di\ Criticità = Indice\ di\ Probabilità + Indice\ di\ Danno}$$

Nella figura sottostante viene rappresentata una matrice di rischio proposta da Sossai e Leoncini (Comunicazione personale, 2000), dove le coordinate sono rappresentate da Indice di Probabilità e Indice di Danno. La casella in alto a destra corrisponde a probabilità massima e

a danno maggiore, mentre la casella in basso a sinistra corrisponde a probabilità minima e a danno minore.

Indice di Probabilità	3	4	5	6
	2	3	4	5
	1	2	3	4
		1	2	3
		Indice di Danno		

Figura 1. Matrice di rischio

Sulla base del risultato ottenuto (Indice di Criticità) si valutano gli interventi necessari ai fini di ridurre al minimo il rischio associato ad una determinata operazione, come riportato nella tabella III.

Tabella III. Interventi necessari in base all'Indice di Criticità

INDICE DI CRITICITA'	INTERVENTI NECESSARI
2	Sono da valutare interventi specifici in fase di programmazione; non si ravvisano interventi urgenti.
3	Occorre mantenere sotto controllo i rischi valutando ipotesi di interventi migliorativi in fase di programmazione.
4	Occorre monitorare costantemente i rischi valutando la necessità di interventi migliorativi nel breve/medio periodo.

segue Tabella III

INDICE DI CRITICITA'	INTERVENTI NECESSARI
5	Occorre intervenire con urgenza per individuare ed attuare gli interventi di prevenzione e protezione che riducano il rischio.
6	Occorre intervenire immediatamente per eliminare/ridurre il pericolo.

Bibliografia

- Ozog, H. Hazard identification analysis and control. Chem. Ing., 2: 161-170 (1985).
- Code of Federal Regulation, 21 CFR 820 (1986).

RISCHIO BIOLOGICO

AGENTI BIOLOGICI

Mariangela Miele, Paola Bet, Dimitri Sossai

Il **rischio biologico** è un rischio difficilmente percepibile e, analogamente al rischio da radiazioni o da sostanze genotossiche, provoca un danno nel tempo difficilmente associabile ad una particolare esposizione.

Esistono numerose informazioni riguardo la pericolosità degli agenti chimici e fisici, ma non si può dire altrettanto per gli agenti biologici.

Gli agenti biologici sono agenti infettivi che comprendono batteri, rickettsie, virus, lieviti, muffe, parassiti uni e pluricellulari e prioni. Ciascuna specie di agente infettivo può avere sottotipi, ceppi e varianti che differiscono dal parentale in potenziale patogeno, specificità dell'ospite, trasmissibilità, sensibilità ad agenti antimicrobici ecc. Inoltre, nei laboratori di ricerca biotecnologica si produce una grande varietà di vettori artificiali, allo scopo di aumentare la probabilità di trasferimento genico tra specie non correlate. Questi nuovi frammenti di DNA possono ricombinarsi e dare origine a prodotti pericolosi.

In conclusione, sebbene gli agenti biologici siano ben definiti dalle normative vigenti, è difficile effettuare una completa valutazione dei rischi associati alla loro manipolazione. Numerosi fattori quali la diversità biologica, la complessità chimica delle molecole, la molteplicità delle vie di diffusione e la specificità delle interazioni con l'ospite, come pure la possibile produzione di nuove sequenze codificanti, devono essere considerati per valutare l'effetto di questi organismi sulla salute e l'ambiente.

Un **agente biologico** è definito, secondo la normativa vigente ([Direttive europee 90/679/CEE, 93/88/CEE e 2000/54/CE](#)), come *“un qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano, che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”* in lavoratori esposti.

Un **microrganismo** è definito come un'entità microbiologica, cellulare o meno, in grado di riprodursi o di trasferire materiale genetico.

Gli agenti biologici sono stati classificati in quattro gruppi a seconda del livello di rischio di infezione (2000/54/CE):

Gruppo 1	Agente biologico che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani.
Gruppo 2	Agente biologico che può causare malattia in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.
Gruppo 3	Agente biologico che può causare gravi malattie in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche.
Gruppo 4	Agente biologico che può provocare gravi malattie in soggetti umani e rappresenta un serio rischio per i lavoratori; può presentare un elevato rischio di diffusione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche.

In [Allegato I](#) è riportata la classificazione degli agenti biologici. Tale classificazione riflette lo stato delle conoscenze al momento in cui è stata concepita e dovrà essere aggiornata non appena non rifletterà più lo stato delle conoscenze.

L'[Allegato I](#) include unicamente gli agenti che possono provocare malattie in soggetti umani; non sono presi in considerazione gli agenti patogeni di animali e piante di cui non sono noti gli effetti sull'uomo.

Microrganismi geneticamente modificati

Un **microrganismo geneticamente modificato** (MOGM) secondo la [Direttiva 98/81/CE](#), è “*un microrganismo (entità microbiologica,*

cellulare e non cellulare, capace di replicarsi o trasferire materiale genetico, compresi virus, viroidi, cellule animali e vegetali in coltura) il cui materiale genetico è stato modificato in un modo non naturale, mediante moltiplicazione o ricombinazione naturale.”

Sono considerate non naturali:

- Tecniche di ricombinazione di acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo diverso da un organismo, in un virus, in un plasmide batterico o in altro sistema vettore e il loro inserimento in un organismo ospite nel quale non si presentano in natura ma nel quale sono in grado di moltiplicarsi in maniera continuativa.
- Tecniche che ricorrono all'introduzione diretta in un microrganismo di materiale ereditabile preparato al di fuori dello stesso, comprese la microinoculazione, la macroinoculazione e la microincapsulazione.
- Tecniche di fusione cellulare o di ibridazione che producono cellule vive con nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile mediante la fusione di due o più cellule con metodi non presenti in natura.

Fecondazione in vitro, traduzione, trasformazione, coniugazione e induzione della poliploidia non sono considerate come il risultato di modificazioni genetiche.

Un MOGM teoricamente è separabile in: organismo **ospite**, nel quale l'informazione genica viene inserita; organismo **donatore**, dal quale l'informazione viene ottenuta; **vettore** che trasferisce l'informazione tra questi organismi; **inserto** che contiene uno o più geni in grado di rivelare l'attività biologica.

Ciascuna di queste parti, insieme al costrutto finale deve essere presa in considerazione al fine di ottenere un'accurata e corretta valutazione del rischio.

I vettori sono, per definizione, plasmidi, batteriofagi, virus ed altri elementi di DNA con capacità di replicazione autonoma, in cui viene inserito un frammento di DNA estraneo (inserto). Un vettore contiene

uno o più siti di replicazione e geni che conferiscono un qualche carattere fenotipico alle cellule che li ospitano (es. resistenza ad antibiotici). Il vettore può integrarsi o meno nel DNA dell'ospite.

I vettori utilizzati nei laboratori di ricerca biotecnologica sono molteplici, qualsiasi elenco risulterebbe quindi incompleto. Si riportano di seguito solo alcune considerazioni relative ai vettori utilizzati nella sperimentazione in terapia genica e nella produzione di piante transgeniche, in quanto rappresentano le applicazioni più recenti delle tecnologie del DNA ricombinante.

Terapia genica. Il termine **terapia genica** definisce una serie di interventi volti a modificare intenzionalmente il materiale genetico allo scopo di prevenire o curare una patologia.

La modificazione serve a correggere un difetto genetico determinato dall'assenza o alterazione di una proteina, o ad aggiungere un'informazione genica che modifica le caratteristiche della cellula.

La modificazione genetica si può ottenere su cellule "in vitro" oppure direttamente "in vivo" attraverso l'impiego di vettori capaci di trasferire geni e quindi di modificare il patrimonio genetico delle cellule bersaglio (Jones, 1995).

I prodotti per terapia genica comprendono:

- acidi nucleici liberi o complessati
- cellule geneticamente modificate
- vettori virali

Attualmente i vettori virali risultano essere tra i più efficaci metodi per il trasferimento genico. Essi agiscono attraverso una vera "infezione" delle cellule bersaglio, trasferendo il gene terapeutico attraverso i loro naturali meccanismi biologici (Kay et al., 2001).

I vettori utilizzati in terapia genica sono prevalentemente difettivi per replicazione ovvero possono infettare una sola volta e non possono moltiplicarsi dentro la cellula bersaglio, a meno di una "ricombinazione genica" accidentale.

Oltre ad essere incapaci di replicare questi vettori sono privi di attività litica.

I vettori virali utilizzati in terapia genica derivano da **retrovirus, adenovirus, parvovirus, herpesvirus e poxvirus**.

I vettori più utilizzati derivano da **retrovirus** di tipo aviario e murino (Miller et al., 1990). Le caratteristiche principali dei retrovirus sono:

- una relativa semplicità genetica
- la proprietà di infettare ad alta efficienza una vasta serie di tipi cellulari
- il materiale genetico costituito da RNA a singola elica

L'RNA contenuto nel retrovirus si integra nel genoma della cellula ospite sotto forma di DNA (DNA provirale). La trasformazione dell'RNA in DNA avviene ad opera di una polimerasi specifica chiamata trascrittasi inversa. La forma provirale di un retrovirus ha un genoma costituito da due sequenze "long terminal repeats" (LTR) e da tre geni fondamentali, che codificano le proteine del core nucleoproteico (gene *gag*), le proteine del pericapside (gene *env*) e la trascrittasi inversa/integrasi/proteasi (gene *pol*). Il provirus integrato può essere a tutti gli effetti considerato alla stregua di un qualsiasi gene cellulare: la sua replicazione coincide con il processo di trascrizione, che è condotto dalla polimerasi II cellulare e regolato dai fattori di trascrizione cellulari che si legano al LTR all'estremità 5' del provirus.

I **lentivirus** sono una sottoclasse di retrovirus in grado di infettare anche cellule che non sono in attiva divisione o terminalmente differenziate come i neuroni (Naldini et al., 1996). I principali vettori a lentivirus derivano dal virus dell'immunodeficienza felina, virus dell'anemia infettiva equina, virus dell'immunodeficienza della scimmia e virus umani fra i quali l'HIV.

Gli **adenovirus** sono indicati in terapia genica quando è richiesta un'espressione ad alti livelli e per tempi brevi del gene trasferito, dal momento che la forte immunogenicità delle proteine di struttura dell'adenovirus inducono una potente risposta immunitaria che limita l'efficacia del trasferimento del gene dopo la prima infezione (Berkner, 1992). Gli adenovirus sono virus umani infettivi, che spesso causano lievi malattie respiratorie, pur tuttavia in rari casi si possono verificare malattie più gravi. Pertanto l'uso di vettori da loro derivati, in conside-

razione anche del fatto che si trasmettono per via aerea, richiede particolare attenzione.

In terapia genica vengono utilizzati un sottogruppo dei parvovirus, i **virus adeno - associati (AAV)**. Essi sono piccoli virus che si replicano in associazione con adenovirus difettivi e pertanto completamente dipendenti dagli adenovirus stessi. Gli AAV sono piccoli virus a DNA a singola elica; in colture cellulari il DNA di AAV si integra con alta frequenza nel genoma delle cellule ospiti e si replica con esso (Bern, 1995).

Gli **herpesvirus** includono virus infettivi umani quali il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1), che è il sistema vettore più comunemente utilizzato. HSV-1 è comune nella popolazione, ma in rari casi può causare encefaliti; la sua utilità come sistema vettore risiede nella sua ampia gamma di cellule ospiti, tra cui i neuroni, e nella sua capacità di accogliere grossi inserti.

I **poxvirus** sono altamente stabili e includono sia virus aviari (avipox) che non sono in grado di stabilire infezioni produttive negli umani, che virus di mammiferi (virus vaccinia e i virus vaccinia modificati) che possono infettare l'uomo. Grazie alla loro forte immunogenicità, questi vettori virali sono stati usati con successo in protocolli di terapia immunogenetica, permettendo l'attivazione di risposte immunitarie contro antigeni tumorali trasportati in cellule dendritiche.

Il personale di laboratorio che utilizza i vettori sopra descritti è esposto a rischio nel momento in cui i dispositivi di protezione individuale o collettiva non vengano utilizzati adeguatamente o quando non vengano seguite le procedure di lavoro volte a proteggere l'operatore dal contatto con tali microrganismi.

Le problematiche legate alla sicurezza nell'utilizzo e nella manipolazione dei vettori virali sono ovviamente acuite nel momento in cui si utilizzano virus in grado di infettare le cellule umane.

La pericolosità di un vettore dipende comunque anche dallo stato di competenza immunologica dell'ospite.

Piante transgeniche. Il metodo di elezione per la produzione di piante geneticamente modificate è la trasformazione mediata da **agrobatteri**. Gli agrobatteri sono batteri Gram-negativi comuni abitanti del suolo,

in grado di infettare un gran numero di specie vegetali. *L'Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* sono le specie maggiormente sfruttate e quindi le più studiate: essi causano il tumore del colletto e la malattia della radice capelluta, rispettivamente. Gli effetti patogeni sono mediati da plasmidi batterici Ti (tumor inducing) o Ri (root inducing), plasmidi piuttosto grandi le cui dimensioni variano da 140 a 235 Kb (Melchers and Hooykaas, 1987). L'importanza dell'agrobatterio risiede nella sua capacità di trasferire parte del DNA plasmidico nel cromosoma della cellula ospite vegetale. La regione trasferita (T-DNA) del plasmide Ti e Ri viene integrata ed espressa nel genoma della pianta; l'espressione di questi geni induce lo sviluppo del tumore del colletto e la malattia delle radici capellute rispettivamente. Il T-DNA induce anche la produzione e la secrezione delle opine, derivati amminoacidici che l'agrobatterio utilizza come nutrimento.

Il T-DNA ha una lunghezza di 14-42 Kb ed è delimitato da sequenze "border" conservate di 25 pb: LB (bordo sinistro) e RB (bordo destro). Tutte le sequenze comprese tra LB e RB si integrano nei cromosomi della cellula vegetale. Altri geni presenti nel plasmide non vengono trasferiti, ma sono necessari per la produzione di proteine regolatrici, essenziali per la trasformazione. Tra questi si trovano i geni *vir* (virulenza) che producono proteine responsabili del taglio, trasferimento ed integrazione del T-DNA nel genoma della cellula vegetale ed i geni responsabili del catabolismo delle opine, che permettono all'agrobatterio di utilizzare le opine secrete in tumori e radici capellute. In [fig. 2](#) è schematizzata la struttura del plasmide Ti (Draper et al., 1988).

Un altro gruppo di geni coinvolto indirettamente nella trasformazione è presente nel cromosoma batterico ed è responsabile del legame tra le cellule batteriche e le cellule vegetali.

I geni per la virulenza sono attivati in agrobatterio da sostanze fenoliche (tra cui l'acetosiringone) prodotte da cellule vegetali lesionate.

I geni patogeni dei plasmidi Ti ed Ri non sono necessari per il processo di trasferimento, essi possono quindi essere rimossi e sostituiti con i geni da inserire nella pianta. I plasmidi Ti e Ri sono troppo grandi e non sono adatti come vettori primari. I geni estranei vengono quindi inseriti in questi vettori principalmente attraverso il sistema del vettore

binario (Fraley et al., 1986; Klee et al., 1987).

Altri sistemi disponibili per la produzione di piante geneticamente modificate, quali l'uso di virus come vettori, l'elettroporazione ed il bombardamento di microproiettili sono gli stessi di quelli utilizzati per la trasformazione di cellule animali.

Gli agrobatteri come altri fitopatogeni non sono compresi nella classificazione europea degli agenti biologici, [Allegato I](#); i ricercatori che operano in tale campo sono forse meno a rischio, ma hanno maggiori difficoltà a reperire informazioni sulla pericolosità degli agenti biologici utilizzati.

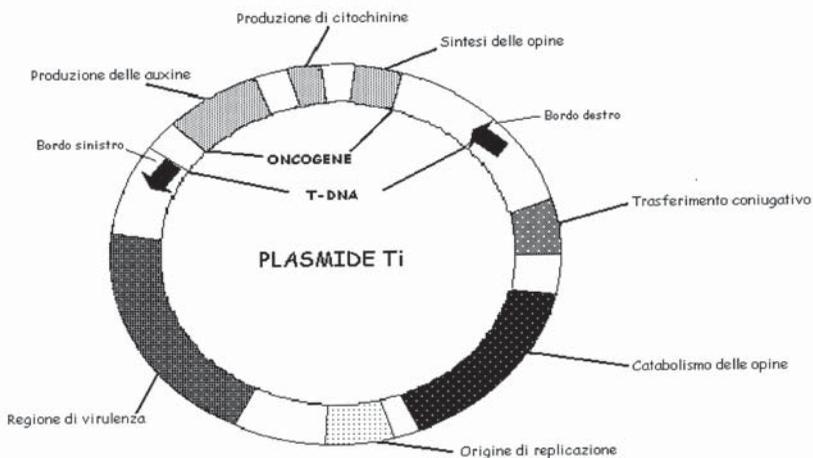


Figura 2. Struttura del plasmide Ti dell'*Agrobacterium tumefaciens*

Bibliografia

- Berkner K.L. Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:39-66 (1992).
- Bern KI., Linden R.M. The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays*, 17:237-45 (1995).
- Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R., *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. Eds. Draper J., Scott R., Armitage P., Blackwell Scientific Publications (1988)

- Fraley, R.T., Rogers, S.G. & Horsch, R.B. Genetic transformation in higher plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 4: 1-46 (1986).
- Jones L.K., Tuddenhan E.G. Gene therapy for the haemophilias. *Gene Ther.*, 2: 699-701 (1995).
- Kay M.A., Glorioso J.C. and Naldini L., Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics". *Nature Medecine* 7: 33-40 (2001).
- Klee H., Horsch R. & Rogers S. Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 467-86 (1987).
- Melchers L.S. and Hooykaas P.J.J. Virulence of Agrobacterium. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 4, 167-220 (1987).
- Miller D.G., Adam M.A. and Miller A.D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4239-4242 (1990).
- Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gare F.H., Verma I.M. and Trono D In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272: 263-7 (1996).

VALUTAZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO

Paola Bet, Mariangela Miele, Bernardetta Ledda, Dimitri Sossai

Le procedure da seguire per una corretta valutazione del rischio per l'impiego di agenti biologici sono definite dalla direttiva [2000/54/CE](#).

La [Direttiva 98/81/CE](#), che modifica la precedente [90/219/CEE](#), regola invece l'**impiego confinato** dei Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM).

*Per **impiego confinato** si intende “ciascuna attività nella quale i microrganismi sono modificati geneticamente e nella quale tali MOGM sono messi in coltura, conservati, trasportati, distrutti, smaltiti o altrimenti utilizzati, e per la quale vengono usate specifiche misure di contenimento al fine di limitare il contatto degli stessi con la popolazione e con l'ambiente”.*

La valutazione del rischio è un processo complesso che richiede l'identificazione di numerosi fattori. Nel caso specifico di attività che possono comportare un rischio di esposizione ad agenti biologici, si deve determinare la natura del rischio, il grado di esposizione e la durata dell'esposizione, in modo da poter valutare i rischi per la salute o la sicurezza dei lavoratori e determinare le misure da adottare.

I rischi connessi alla manipolazione di agenti biologici sono generalmente associati ad un possibile contatto tra l'operatore, o la comunità in generale, ed il microrganismo. Pertanto si devono prendere in considerazione i seguenti parametri:

- il rischio proprio del microrganismo
- il rischio dell'attività

Per il **rischio proprio del microrganismo** si deve, in primo luogo, prendere in considerazione la classificazione degli agenti biologici riportata in Allegato I e quindi determinarne la pericolosità. Tale pericolosità è influenzata da molteplici fattori tra cui:

- Il potere patogeno, cioè la capacità di un agente di causare ma-

lattie che varia a seconda del sottotipo, ceppo o resistenza dell'agente biologico. Ad esempio il virus *Ebola* è considerato di massima pericolosità ed è quindi collocato in gruppo 4. Il ceppo pericoloso però è *Ebola Zaire* mentre *Ebola Reston* sembra non causare malattia nell'uomo. *Escherichia Coli* è un normale saprofito della flora intestinale, però il ceppo 0157H7 è mortale per l'uomo.

- La virulenza, che rappresenta il grado di patogenicità. La virulenza dipende dall'infettività e dalla gravità della malattia provocata dall'agente biologico ed è influenzata dalla modalità di trasmissione dell'infezione. Ad esempio le spore del bacillo antrace, quando sono inalate possono causare una polmonite fatale, ma se introdotte attraverso la pelle causano una lesione cutanea. Fino a quando non si conosce con certezza la virulenza di un ceppo isolato sarebbe bene considerare tale ceppo patogeno e virulento.
- La dose infettiva. Generalmente campioni diluiti di agenti con bassa infettività sono più pericolosi di campioni concentrati di agenti con elevata infettività.
- La gravità della malattia e la disponibilità di trattamenti terapeutici efficaci. Ad esempio lo stafilococco aureo, che è un comune abitante della cute umana e può causare una grande varietà di patologie generalmente curabili con antibiotici, è classificato come agente biologico di gruppo 2; il bacillo antrace, seppure fatale per inalazione, appartiene al gruppo 3 in quanto è sensibile agli antibiotici; virus capaci di determinare gravissime patologie come HIV e HCV rientrano nel gruppo 3 in quanto non trasmissibili o poco trasmissibili per via aerea.
- Il metodo di trasmissione dell'agente infettivo. La via di trasmissione di un determinato agente può essere singola o multipla. Alcuni agenti infettivi possono essere trasmessi attraverso vie multiple.

Vi sono inoltre altri fattori che partecipano al processo infettivo e sono: la resistenza o la suscettibilità dell'ospite, la via di esposizione e la dose di agenti infettanti. Inoltre la suscettibilità dell'ospite è de-

terminata da molti fattori tra i quali l'età, l'origine etnica, il sesso, lo stato di salute, la gravidanza e le vaccinazioni eseguite.

Per i microrganismi non ancora classificati, se è noto almeno il genere di appartenenza, vengono analizzati i gruppi di rischio cui appartengono altre specie del genere. Qualora non fosse noto il genere di appartenenza, può venire valutata la possibilità, in base alle caratteristiche dell'operazione, di incontrare specie patogene nei substrati utilizzati e quindi analizzare i gruppi di rischio cui appartengono queste specie.

La valutazione del rischio di MOGM deve inoltre tener conto della pericolosità dell'organismo ricevente (ospite), dell'organismo donatore, dell'inserito e del costruito finale.

Il rischio dell'attività è relativo alla tipologia delle manipolazioni svolte col microrganismo. Gli operatori manipolano diversi tipi di campioni (fluidi biologici, urine, sangue, siero, tessuti) che possono essere contaminati con agenti biologici: colture cellulari, colture liquide o in agar di batteri, virus. Il livello di rischio a cui gli operatori sono esposti dipende dalla natura del campione. Campioni di sangue, siero o tessuti probabilmente contengono una concentrazione più bassa di agente infettivo e di conseguenza rappresentano un minor rischio. Le colture purificate e concentrate di cellule batteriche o virus in soluzione sono a più alto rischio.

In laboratorio la contaminazione può avvenire tramite aerosol, ingestione, esposizione delle mucose, inoculazione parentale. L'aerosol è considerato il modo di trasmissione più a rischio di un agente infettivo. Gli aerosol si possono generare attraverso la manipolazione di liquidi, la frammentazione di tessuti, la preparazione di piastre batteriche, l'uso improprio di attrezzature di laboratorio (es. centrifughe), o la rottura di contenitori con colture cellulari (Collins, 1983).

Altre modalità con cui un operatore può entrare in contatto con un agente biologico possono essere:

- Inoculazione accidentale, ad esempio per puntura o taglio della cute con strumenti infetti od oggetti acuminati quali aghi, bisturi, o vetreria rotta.

- Ingestione accidentale, ad esempio pipettare a bocca o mangiare e bere all'interno del laboratorio.
- Contatto diretto con parti del corpo esposte (faccia, occhi), ad esempio tramite schizzi generati da agitazioni violente, dall'uso di siringhe o per versamento di liquidi.

Si devono inoltre considerare, ai fini della valutazione del rischio, le attività di manipolazione genetica degli agenti biologici, finalizzate al trasferimento di geni esogeni in animali, piante o uomo durante le quali viene prodotta una grande varietà di acidi nucleici (costrutti).

I costrutti generalmente contengono geni marcatori per la resistenza agli antibiotici e, a seconda dei casi, un gran numero di geni derivanti da batteri patogeni, virus ed altri parassiti appartenenti a tutti i regni degli organismi viventi (Ho et al., 1998). La maggior parte dei costrutti che si producono non sono mai esistiti in natura e possono quindi essere potenziale causa di danno (Traavik, 1999a) per l'ambiente e per la salute.

Per molto tempo si è pensato che il DNA fosse rapidamente degradato nell'ambiente esterno e quindi non in grado di essere assorbito dalla pelle o dal tratto intestinale. Queste supposizioni sono state superate da studi sperimentali che hanno evidenziato che il DNA persiste in tutti gli ambienti ed è prontamente assorbito dalle cellule di tutti gli organismi. Alte concentrazioni di DNA nudo sono state infatti trovate in tutti gli ambienti naturali: nel suolo, nei sedimenti marini e di acqua dolce, nell'interfaccia aria-acqua, dove mantengono la capacità di trasformare i microrganismi (Lorenz and Wackernagel, 1994; Ho, 1998; Ho et al., 1998). Il DNA persiste anche nella bocca (Mercer et al., 1999) e nel tratto digestivo dei mammiferi (Schubbert et al., 1994), dove può essere assorbito e incorporato dalla popolazione microbica e dalle cellule ospiti. Mercer ha riportato che il DNA plasmidico parzialmente degradato è in grado di trasformare lo streptococco gordonii, che risiede normalmente nella bocca e nella faringe umana e che la saliva umana contiene fattori che aumentano la capacità dei batteri ad essere trasformati (Mercer et al., 1999).

La capacità del DNA di penetrare nella pelle intatta è nota dal 1990, quando alcuni ricercatori hanno messo in evidenza che l'applicazione

cazione di DNA clonato di un oncogene umano sulla schiena di un topo, induce lo sviluppo di tessuti tumorali (Brown, 1990).

Infine studi recenti hanno dimostrato come acidi nucleici possano prontamente entrare in ogni tipo di cellule umane e di mammiferi. Acidi nucleici possono infatti con successo essere somministrati per aerosol (Yei et al., 1994), tramite applicazioni locali agli occhi (Noisakran et al., 1999), attraverso l'orecchio interno (Yamasoba et al., 1999) e i follicoli del cuoio capelluto (Hoffman, 2000), per iniezione intramuscolare diretta (Budker et al., 1998), attraverso la pelle (Khavari et al., 1997) o per bocca (During et al., 1998).

Gli studi riportati precedentemente si riferiscono alla manipolazione genetica dei microrganismi utilizzati per la trasformazione delle cellule o organismi animali o nella terapia genica. Per quanto riguarda la manipolazione genetica delle piante i rischi che vengono maggiormente presi in considerazione sono relativi all'ambiente ed al trasferimento orizzontale dei geni per la resistenza agli antibiotici alla microflora del suolo. L'uso degli agrobatteri, sistema di elezione per la trasformazione genetica delle piante (vedi in precedenza), non è considerato a rischio per l'operatore, in quanto è opinione diffusa che il processo che porta all'escissione prima ed all'integrazione poi del DNA plasmidico funziona solo per le cellule vegetali. Un recente lavoro ha invece riportato che l'agrobatterio, in particolari condizioni sperimentali è in grado di trasferire il proprio DNA plasmidico anche in cellule animali ed umane (Kunik et al., 2001). Ulteriori approfondimenti sono necessari per verificare se un rischio effettivamente esiste per gli operatori che utilizzano gli agrobatteri, nel frattempo si suggerisce di utilizzare questi microrganismi in laboratori con adeguati livelli di contenimento, anche se non sono inclusi nella lista europea degli agenti biologici (Allegato I).

Il processo di valutazione del rischio biologico, che deve necessariamente tener conto di quanto precedentemente riportato, ha lo scopo di ridurre al minimo il rischio di esposizione durante la manipolazione di agenti biologici attraverso l'uso di specifiche misure di contenimento. A questo scopo le attività che coinvolgono l'uso di agenti biologici, in particolare dei MOGM vengono distinte in 4 classi:

Classe 1	Operazioni che presentano rischi nulli o trascurabili, ovvero operazioni per le quali un livello 1 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente.
Classe 2	Operazioni a basso rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 2 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente.
Classe 3	Operazioni che presentano un rischio moderato, ovvero operazioni per le quali un livello 3 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente.
Classe 4	Operazioni ad alto rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 4 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente.

Qualora sussista un dubbio su quale classe sia appropriata per l'impiego confinato proposto, si devono applicare le misure di protezione più rigorose, a meno che esistano prove sufficienti, d'intesa con l'autorità competente, a giustificare l'applicazione di misure meno rigorose.

Notifica all'Autorità Competente

La notifica è la presentazione delle informazioni richieste alle Autorità Competenti dello Stato di appartenenza ed è prevista sia per gli agenti biologici che per i microrganismi geneticamente modificati.

Notifica per l'uso di agenti biologici

Coloro che intendono lavorare, per la prima volta, con un agente biologico

- di gruppo 2
- di gruppo 3
- di gruppo 4

devono inviare una notifica all'Autorità Competente del proprio Paese nei termini previsti dalla [Direttiva 2000/54/CE](#) (art. 13).

La notifica deve essere eseguita almeno 30 giorni prima dell'inizio del lavoro (od in modo differente in conformità con l'adozione della Direttiva Europea in ciascun Paese).

Un'ulteriore notifica deve essere eseguita qualora si presentassero sostanziali cambiamenti per la salute e per la sicurezza dei lavoratori, che rendano sorpassata la precedente notifica.

Notifica per l'uso di MOGM

Coloro che intendano procedere per la prima volta in un determinato impianto ad un impiego confinato sono tenuti a sottoporre alle Autorità Competenti del proprio Stato, prima di iniziare tale impiego, una notifica nei termini previsti dalla [Direttiva 98/81/CE](#) (Allegato V parte A).

Dopo tale notifica, il successivo impiego confinato della classe 1 può aver luogo senza ulteriori notifiche. Gli utilizzatori dei MOGM per impiego confinato di **classe 1** devono però conservare i verbali relativi alla valutazione del rischio e devono metterli a disposizione delle autorità competenti.

Per l'impiego confinato di **classe 2** in impianti già notificati, deve essere presentata una notifica sia in occasione del primo impiego che di quelli successivi secondo le indicazioni contenute nell'Allegato V, parte B.

Anche per gli impieghi confinati di **classe 3** e **4** in impianti già notificati deve essere presentata una notifica, sia in occasione del primo impiego che di quelli successivi secondo le indicazioni contenute nell'Allegato V, parte C.

Un impiego confinato della classe 3 o di una classe più elevata non può aver luogo senza l'approvazione dell'Autorità Competente, che comunica la sua decisione per iscritto:

- Entro e non oltre 45 giorni dalla presentazione di una nuova notifica, se gli impianti sono stati oggetto di una precedente notifica relativa a impieghi confinati della classe 3 o di una classe più elevata e se sono stati rispettati gli obblighi previsti dall'autorizzazione per un impiego confinato della stessa classe o di una classe superiore a quella in cui si intende ricorrere.

- Entro e non oltre 90 giorni dalla presentazione della notifica negli altri casi.

Per tutta la durata dell'impiego confinato è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che siano applicate le misure di contenimento o le altre misure di protezione per la classe assegnata all'impiego confinato, nonché conservare i quaderni in cui vengono registrate le operazioni eseguite. L'utilizzatore inoltre dovrà riesaminare periodicamente la valutazione della classe di impiego e redigere un documento di riesame.

Bibliografia

- Brown, P. Naked DNA raises cancer fears for researchers. *New Scientist* 6 October, 17 (1990).
- Budker, V., Zhang, G., Danko, I., Williams P. and Wolff, J. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Therapy*, 5: 272-6 (1998).
- Collins, C.H. *Laboratory acquired infections: History, incidence, causes and prevention*. Butter-worths, and Co. Ltd: Oxford, England (1983).
- During, M.J., Xu, R., Young, D., Kaplitt, M.G., Sherwin, R.S., Leone, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat. Med.*, 4: 1131-5 (1998).
- Ho, M.W. *Genetic Engineering Dream or Nightmare? The Brave New World of Bad Science and Big Business*, Gateway Books, Bath 2nd ed., Gateway, Gill & Macmillan, Dublin (1998, 1999).
- Ho, M.W., Traavik, T., Olsvik, R., Tappeser, B., Howard, V., von Weizsacker, C. and McGavin, G. *Gene Technology and Gene Ecology of Infectious Diseases. Microbial Ecology in Health and Disease*, 10: 33-59 (1998b).
- Hoffman, R.M. The hair follicle as a gene therapy target. *Nature Biotechnology*, 18: 20-1 (2000).
- Khavari, P.A. Cutaneous gene therapy. *Advances in Clinal Research*, 15: 27-35 (1997).
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citowsky, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 1871-1876 (2001).
- Lorenz, M.G., Wackernagel, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, 58: 563-602 (1994).
- Mercer, D.K., Scott, K.P., Bruce-Johnson, W.A. Glover, L.A., Flint, H.J. Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 6-10 (1999).
- Noisakran, S., Campbel, I.L., Carr D.J. Ecotopic expression of DNA encoding

- IFN-alpha 1 in the cornea protects mice from herpes simplex virustype 1-induced encephalitis. *J Immunol*, 162: 4184-90 (1999).
- Schubbert, R., Lettmann, C., Doerfler, W. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular and General Genetics*, 242: 495-504 (1994).
 - Traavik, T. Too early may be too late: Ecological risks associated with the use of naked DNA as a biological tool for research, production and therapy. Reported to the Directorate of Nature Management, Norway: 29-31 (1999a).
 - Yamasoba, T., Yagl, M., Roessler, B.J., Miller, J.M., Rapheal, Y. Inner ear transgene expression after adenoviral vecotr inoculation in the endolymphatic sac. *Hum Gene Ther*, 10: 744-69 (1999).
 - Yei, S., Mittereder, N., Wert, S., Whitsett, J.A., Wilmott, R.W., Trapnell, B.C. In vivo evaluation of the safety of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the lung. *Hum. Gene Ther.*,15: 731-744 (1994).

PREVENZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO

Paola Bet, Mariangela Miele, Modesto Roman Delgado, Rosa Montero Simò, Dimitri Sossai

La valutazione del rischio biologico ha lo scopo di individuare le diverse tipologie di pericoli connessi alla manipolazione degli agenti biologici al fine di rimuovere, o ridurre ad un livello accettabile, il rischio di contaminazione degli operatori, dei campioni, dell'ambiente e della comunità in genere (Rodricks, 1994). Il controllo del rischio viene effettuato attraverso la definizione e l'adozione di adeguate misure di prevenzione quali:

- adeguati livelli di contenimento
- adeguate attrezzature
- adeguate norme di comportamento in laboratorio
- adeguate misure di protezione collettive e/o individuali

Per la rimozione o la riduzione del rischio di contaminazione risulta inoltre di fondamentale importanza la professionalità, l'addestramento, l'esperienza ed il buon senso dell'operatore; fanno quindi parte integrante del programma di prevenzione la formazione e l'aggiornamento periodico del personale e l'elaborazione di un manuale con l'indicazione di apposite procedure da adottare durante le attività o in caso di incidente.

Il manuale di biosicurezza dovrebbe necessariamente essere presentato e consegnato a tutti coloro che intraprendono per la prima volta una qualsiasi attività con agenti biologici.

Livelli di contenimento dei laboratori

I livelli di contenimento definiscono i requisiti minimi necessari per fornire un'adeguata protezione al personale che lavora con agenti biologici ed impedire la contaminazione dell'ambiente circostante.

Qualunque siano le attività svolte in un laboratorio si devono tenere

comunque presenti le seguenti indicazioni:

- Il laboratorio dovrebbe essere dotato di spazi sufficientemente ampi in modo da operare senza possibilità di scontri accidentali tra le persone e contro le apparecchiature.
- Muri, soffitti e pavimenti dovrebbero essere lisci, di facile pulizia. Sono consigliabili pavimenti in PVC con giunzioni elettrosaldate.
- Tubi e condotti esterni dovrebbero essere evitati e, nel caso fossero presenti, essere separati dai muri.
- Le superfici dei banconi da lavoro dovrebbero essere impermeabili, resistenti ai disinfettanti, agli acidi, ai solventi organici, agli alcali e con alto grado di resistenza al fuoco.
- L'arredo del laboratorio dovrebbe essere resistente, saldamente ancorato e facilmente accessibile alle operazioni di pulizia sia all'esterno che tra i ripiani interni.
- I ripostigli dovrebbero essere utilizzati per contenere oggetti di uso immediato evitando così disordine sui banconi e nelle zone di passaggio.
- Uno spazio idoneo alla conservazione a lungo termine del materiale utilizzato in laboratorio, convenientemente situato al di fuori dell'area di lavoro dovrebbe essere contemplato.
- Un lavabo azionabile tramite il piede o il gomito, in preferenza vicino all'uscita, dovrebbe essere presente.
- Un apparato lavaocchi dovrebbe essere presente e prontamente accessibile.
- Le porte dovrebbero avere un'adeguata resistenza al fuoco, chiudersi da sole ed avere pannelli trasparenti.
- Un'autoclave per la decontaminazione dei rifiuti infetti dovrebbe essere disponibile in ogni laboratorio o all'interno dello stesso fabbricato.
- Gli indumenti personali dovrebbero essere riposti in ambienti separati da quelli dove vengono riposti gli indumenti da lavoro.

Si distinguono 4 livelli di contenimento a seconda delle operazioni svolte all'interno del laboratorio.

Livello di contenimento 1

Il livello di contenimento 1 è indicato quando si compiono operazioni che presentano rischi nulli o trascurabili per la salute umana e per l'ambiente. Nel laboratorio devono essere applicate le misure minime di contenimento e di protezione. La stanza dove si svolgono le operazioni dovrebbe essere separata dall'esterno tramite una porta che dovrebbe rimanere chiusa durante le attività. Si consiglia la presenza di un lavandino.

Livello di contenimento 2

Il livello di contenimento 2 è indicato quando si compiono operazioni che presentano basso rischio per la salute umana e per l'ambiente. Questo livello di contenimento prevede la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe I o II per proteggere il lavoratore da eventuali formazioni di aerosol. Il segnale di rischio biologico deve essere esposto sulla porta del laboratorio. Deve essere presente un'autoclave nel laboratorio o nell'edificio al fine di poter inattivare i rifiuti prima dello smaltimento.

Livello di contenimento 3

Il livello di contenimento 3 è indicato quando si compiono operazioni che presentano un rischio moderato per la salute umana e per l'ambiente. L'accesso al laboratorio è strettamente controllato ed è necessaria la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe I o II. Il segnale di rischio biologico deve essere esposto sulla porta del laboratorio. Deve essere presente un'autoclave in laboratorio oppure nel piano. In quest'ultimo caso si devono adottare procedure che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio. L'accesso a tali laboratori deve avvenire attraverso una zona filtro, (fig. 3). Il lato della zona filtro esente da contaminazione deve essere separato dalla parte ad accesso limitato da uno spogliatoio o da impianti doccia e, preferibilmente, da porte autobloccanti. All'interno dei laboratori la pressione deve essere negativa. L'aria emessa dal laboratorio deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA). La zona di lavoro deve essere sigillabile in modo da consentire la fumigazione (Richmond 1999; Richmond, 2000).

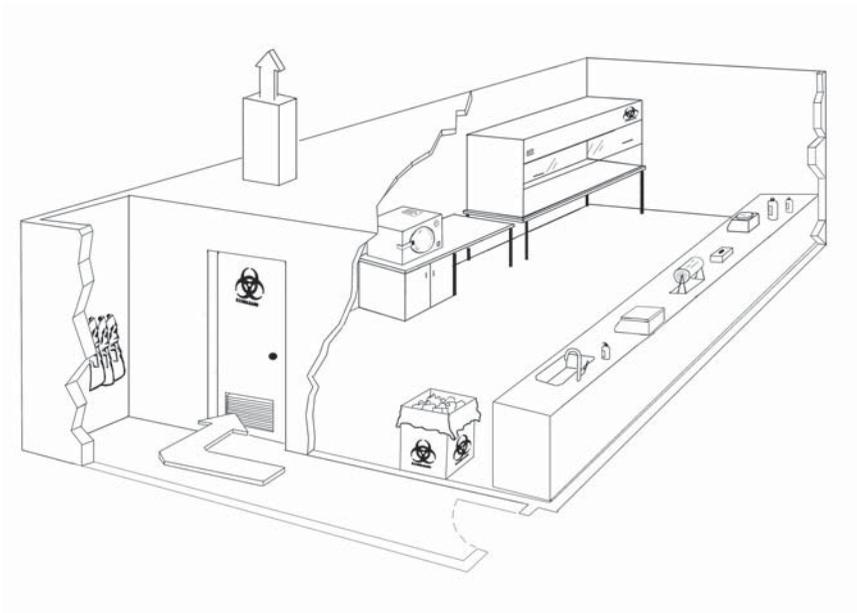


Figura 3. Livello di contenimento 3

Livello di contenimento 4

Il livello di contenimento 4 è indicato quando si compiono operazioni che presentano un alto rischio per la salute umana e per l'ambiente. Il laboratorio deve essere separato dalle altre zone dello stesso edificio o deve trovarsi in un edificio separato. L'accesso al laboratorio è strettamente controllato ed è necessaria la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe I, II o III. Deve essere presente un'autoclave a doppia entrata. L'accesso a tali laboratori deve avvenire attraverso una zona filtro all'interno della quale deve essere presente una doccia di decontaminazione. All'interno dei laboratori la pressione deve essere negativa. L'aria immessa ed emessa dal laboratorio deve essere sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA).

Le misure di contenimento e altre misure di protezione per le attività di laboratorio sono descritte nella tabella 1a della [direttiva europea 98/81/CE](#).

Attrezzature e principali procedure per il loro utilizzo

Le attrezzature dei laboratori devono avere l'adeguata certificazione CE e possedere apposito manuale di sicurezza scritto nella lingua del Paese di utilizzo con informazioni chiare; dovrebbero inoltre garantire semplicità d'uso, facilità di manutenzione, facilità di accesso per la pulizia e la decontaminazione.

Cappe di sicurezza biologica

Le cappe di sicurezza biologica sono un valido sistema di prevenzione primaria in quanto impediscono la diffusione di materiale biologico potenzialmente pericoloso. Le cappe sono classificate in tre categorie a seconda del livello di protezione che garantiscono agli operatori ed all'ambiente circostante. La scelta della cappa di sicurezza biologica è determinata dal rischio associato agli agenti biologici e MOGM che si utilizzano.

Le cappe a flusso laminare orizzontale, che vengono prevalentemente utilizzate nei laboratori di biotecnologie vegetali, non sono considerate cappe di sicurezza biologica poiché proteggono il campione da eventuale contaminazione, ma non l'operatore.

Le attrezzature presenti nell'area di lavoro o il posizionamento della cappa in prossimità di fonti di calore o di correnti d'aria può alterare il funzionamento della cappa garantendo una minor protezione. Le lampade UV non sono necessarie nelle cappe di sicurezza biologica. Se presenti, le lampade UV dovrebbero essere pulite settimanalmente per rimuovere la polvere e lo sporco che possono diminuire l'effetto germicida dei raggi UV. Le lampade devono essere sempre spente durante le attività, vanno tenute accese per 15 minuti alla fine e almeno 5 minuti prima dell'inizio delle attività. L'efficacia delle lampade deve essere periodicamente controllata.

Le cappe di sicurezza biologica di **classe I** sono utilizzate quando si lavora con agenti biologici a basso rischio; proteggono l'operatore, e l'ambiente circostante da eventuali contaminazioni, ma non il campione. L'aria esterna viene aspirata all'interno della cappa ed espulsa all'esterno dopo essere stata depurata da un filtro HEPA e, qualora fosse ro impiegati anche solventi organici, da un filtro a carbone attivo.

Le cappe di sicurezza biologica di **classe II** sono utilizzate quando si lavora con agenti biologici a rischio moderato; proteggono l'operatore l'ambiente circostante ed il campione da eventuali contaminazioni. L'aria esterna viene aspirata e convogliata nella zona di lavoro dopo essere stata depurata da un filtro HEPA. L'aria in uscita prima di essere inviata all'esterno passa nuovamente attraverso un filtro HEPA.

Le cappe di sicurezza biologica di **classe III** sono utilizzate quando si lavora con agenti biologici ad alto rischio; sono ermeticamente chiuse e mantengono sotto pressione negativa l'ambiente interno. Tutte le operazioni nell'area di lavoro della cappa avvengono attraverso guanti a manicotto posizionati frontalmente. Questo tipo di cappe garantisce protezione pressoché totale per l'operatore, per l'ambiente e per il campione. L'aria che entra passa attraverso un filtro HEPA, attraversa il piano di lavoro e quindi passa attraverso due filtri HEPA oppure un filtro HEPA ed un inceneritore prima di essere emessa all'esterno. Le cappe di classe III sono generalmente installate nei laboratori con il massimo livello di contenimento con accesso strettamente controllato.

Per un buon uso delle cappe di sicurezza biologica si raccomanda la seguente procedura:

- Accendere la cappa e la lampada UV, se presente, 15 minuti prima dell'inizio delle operazioni.
- Accertarsi che il saliscendi, se presente, non permetta un'apertura superiore ai 20 cm, salvo diverse disposizioni della casa produttrice.
- Ridurre al minimo gli strumenti e i reagenti sottocappa.
- Posizionare piccoli contenitori per rifiuti biologici sotto cappa e trasferirli ermeticamente chiusi in contenitori di maggiori dimensioni.
- Non usare Bunsen o altri tipi di bruciatori sotto le cappe di tipo II e III, l'aria calda indotta infatti può deviare il regolare flusso interno, può causare quindi contaminazione sia nell'area di lavoro che nell'ambiente esterno e danni ai filtri HEPA.
- Pulire sempre con cura alla fine di ogni operazione il ripiano della cappa con disinfettante (es. alcool a 70%).

Per ulteriori informazioni sulle cappe di sicurezza biologica consultare la pubblicazione del CDC-NIH ([Primary Containment for Biohazards: Selection, installation and Use of Biological Safety Cabinets, 2000](#)).

Centrifughe

Per un buon uso delle centrifughe occorre tener presente le seguenti considerazioni:

- Posizionarle in modo che siano accessibili a tutto il personale.
- Seguire le indicazioni riportate sul manuale di istruzioni ed effettuare periodica manutenzione.
- Bilanciare i contenitori e gli accessori da centrifuga con liquidi non corrosivi.
- Utilizzare provette da centrifuga di vetro a pareti spesse o di plastica nel caso si centrifughino agenti biologici che presentano un medio o alto rischio e utilizzare preferibilmente provette per centrifuga con tappi a vite contrassegnate secondo un codice stabilito.
- Sigillare debitamente le provette per evitare la diffusione di eventuali aerosol contaminanti.
- Utilizzare centrifughe dotate di rotori anti-aerosol o di apposite chiusure di protezione anti-aerosol nel caso si lavori con agenti biologici di gruppo 2, 3 e 4.
- Centrifugare separatamente dagli altri materiali i liquidi contenenti agenti biologici di gruppo 3 e 4 e aprire e chiudere le provette sotto cappa di sicurezza biologica.
- Ispezionare dopo l'uso i rotori e i contenitori delle centrifughe per accertare l'assenza di corrosioni e di fessure capillari e riportarli capovolti per permettere la fuoriuscita della condensa.

Frigoriferi, congelatori e contenitori di azoto liquido

I frigoriferi, i congelatori ed i contenitori di azoto liquido vengono utilizzati per conservare campioni biologici, reagenti, soluzioni etc. Per un loro corretto utilizzo si devono tenere presenti le seguenti indicazioni:

- Non aprirli frequentemente ed inutilmente.
- Installare i frigoriferi e i congelatori lontano da fonti di calore e staccati dalla parete.
- Utilizzare contenitori adatti a sopportare le basse temperature richieste per la conservazione del materiale.
- Evitare di riempire eccessivamente i contenitori destinati al congelamento.
- Etichettare chiaramente tutti i contenitori con informazioni su contenuto, operatore e data.
- In aggiunta ai guanti per la protezione biologica indossare guanti di protezione per basse temperature per estrarre i campioni conservati a -80°C e in azoto liquido, visiera facciale e grembiule per evitare le ustioni da freddo. Inoltre i contenitori con azoto liquido devono essere tenuti in ambiente abbondantemente ventilato in modo da prevenire possibili incidenti determinati da asfissia per spostamento dell'ossigeno da parte dell'azoto.
- Conservare i prodotti pericolosi in un frigorifero o congelatore dotato di chiave che deve essere custodita da un solo responsabile.
- Conservare le soluzioni infiammabili in appositi frigoriferi per solventi, privi di luce interna.
- Apporre all'esterno di ogni frigorifero o congelatore il nome della persona da contattare in caso di guasto.
- Pulirli periodicamente, per i frigoriferi e i congelatori accertarsi che sia stata staccata la spina. Durante questa operazione indossare una protezione per il viso e guanti di gomma. Il materiale privo di etichetta dovrebbe essere eliminato previa sterilizzazione.
- Utilizzare pinze per asportare contenitori rotti o frammenti di vetro e plastica.
- Disinfettare la superficie interna dei frigoriferi e dei congelatori con etanolo al 70%.

Incubatori

Gli incubatori umidificati sono una fonte di contaminazione molto alta sia per i campioni biologici che per l'ambiente circostante, dovrebbero quindi essere puliti regolarmente. Prima della pulizia rimuovere il

contenuto (fiasche, piastre, ripiani, vassoi etc.) dall'incubatore, pulire poi la parte interna con un detergente non tossico e rimuovere le tracce di detergente con alcol 70% che dovrebbe essere fatto evaporare completamente prima di riporre ripiani, vassoi, fiasche e piastre. Se si lavora con cellule che possono essere pericolose si consiglia di riporre le fiasche o le piastre in contenitori di plastica trasparente (sandwich boxes, [Freshney, 2000](#)) con coperchio sigillabile. Il contenitore deve essere aperto sotto cappa. In caso di versamento delle colture cellulari autoclavare l'acqua contenuta nell'incubatore prima di eliminarla.

Per operazioni con microrganismi di classe 4 o di classe 3 trasmissibili per via aerea sono consigliati incubatori con sistema di aspirazione dell'aria e relativa espulsione esterna attraverso filtri HEPA; oppure posizionare gli incubatori sotto sistemi aspirati con filtrazione dell'aria attraverso filtri HEPA.

Bagni termostatati

I bagni termostatati sono costituiti da vasche che contengono acqua riscaldata da resistenze elettriche. Per rendere omogenea la temperatura nella vasca viene installato un sistema di riciclo o agitazione dell'acqua, pertanto occorre immergere solo contenitori su supporti adeguati e ben chiusi per evitare schizzi o fuoriuscite accidentali dei campioni. È preferibile utilizzare bagni termostatati con coperchio inclinato al fine di impedire che le gocce di vapore condensato vadano a finire sui contenitori immersi. Non appoggiare mai il coperchio in vicinanza di cavi, prese o apparecchi elettrici sotto tensione. Si consiglia inoltre di:

- Installare il bagno termostatato lontano da derivazioni elettriche sotto tensione (prese, cavi, apparecchi).
- Riempire il bagno termostatato con acqua distillata con l'aggiunta di antimuffa o antimicrobico (non utilizzare azide sodica poiché può formare composti altamente esplosivi a contatto con ottone, piombo, rame).
- Sostituire l'acqua almeno ogni 15 giorni e in caso di rovesciamento di campioni, in tal caso smaltirla come rifiuto biologico.
- Periodicamente procedere alla pulizia del bagno termostatato utilizzando guanti.

- Evitare di immergere la mani nude nell'acqua.
- Verificare sempre, prima di procedere ad un'incubazione, la termoresistenza dei contenitori, ciò permette di evitare la dispersione di materiale biologico potenzialmente infetto.

Nel caso si compiano operazioni con agenti biologici, cellule e tessuti di origine umana o animale con attrezzature (ad es. *omogeneizzatori, agitatori per coltura, liofilizzatori, sonicatori*) che possono generare aerosol, si raccomanda di lavorare sotto cappa biologica di sicurezza; quando ciò non è possibile utilizzare appositi dispositivi di protezione individuale ed aprire i contenitori sotto cappa dopo circa 10 minuti per permettere il depositarsi dell'aerosol. I contenitori devono essere di plastica o di vetro spesso, in ogni caso prima dell'uso accertarsi che siano in buone condizioni. Quando si usano sonicatori indossare anche dispositivi per protezione dell'udito (tappi, cuffie).

Norme di comportamento in laboratorio

La maggior parte delle contaminazioni con agenti infettivi che si verificano in laboratorio sono la conseguenza di un errore umano. Per eliminare o limitare il rischio di contaminazione è stata definita una serie di norme igieniche ed operative che tengono in considerazione ogni aspetto del lavoro, dall'organizzazione del laboratorio, alle condizioni in cui questo viene pianificato e il comportamento che ciascun operatore deve adottare durante le attività ([CDC-NIH Guidelines, 1976](#); [CDC-NIH Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999](#); [Manuale di biosicurezza in laboratorio, 1995](#)).

Per norme generali di comportamento si intende l'applicazione delle "Buone pratiche di laboratorio" ovvero una serie di regole che ogni operatore deve seguire al fine di eliminare o limitare i rischi presenti nell'ambiente di lavoro e garantire la qualità del proprio operato.

Le principali norme vengono riportate di seguito:

Norme generali

- L'accesso ai laboratori (compresi gli stabulari) deve essere stret-

tamente controllato.

- Fornire adeguata formazione ed informazione sulla sicurezza biologica a chi svolge attività di laboratorio.
- Adottare un manuale di sicurezza o un protocollo operativo che identifichi rischi noti o potenziali e che specifichi pratiche e procedure da seguire in caso di incidente.
- Informare adeguatamente il personale ogni qualvolta si introducano nuovi rischi.
- Mantenere le porte chiuse durante la sperimentazione.
- Apporre l'apposito segnale di sicurezza biologica sulla porta d'ingresso del laboratorio.
- Mantenere il laboratorio e le gabbie per gli animali puliti, in ordine e sgombri da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro.
- Coprire la superficie di lavoro con carta assorbente plastificata.
- Decontaminare la superficie di lavoro almeno una volta al giorno ed ogni qualvolta si verifichi un versamento di materiale potenzialmente pericoloso, rimuovere la carta assorbente contaminata e riporla in apposito contenitore per rifiuti biologici.
- Non pipettare con la bocca, usare pipettatori meccanici o elettrici.
- Usare un pipettatore di facile decontaminazione e possibilmente autoclavabile.
- Usare pipette o puntali con il filtro per proteggere i pipettatori da eventuali contaminazioni.
- Condurre tutte le procedure tecniche in modo da ridurre al minimo la formazione di aerosol.
- Riporre le pipette contaminate in un contenitore con disinfettante o direttamente nel contenitore per rifiuti biologici.
- Indossare indumenti protettivi monouso o dispositivi di protezione individuali adeguati alle operazioni che si compiono.
- Indossare occhiali, schermi protettivi od altri mezzi di protezione per proteggersi da schizzi o da oggetti contundenti.
- Evitare l'uso di siringhe ed aghi, quando ciò non è possibile seguire le procedure riportate nel paragrafo seguente; aghi ipodermici e siringhe non possono essere usati per rimescolare i fluidi infetti.
- Indossare sempre i guanti durante la sperimentazione con agenti

biologici; toglierli in modo corretto e depositarli nel contenitore per rifiuti biologici.

- Pulire accuratamente i contenitori e le attrezzature contaminate da sangue o altro materiale biologico potenzialmente pericoloso con ipoclorito di sodio o altri sistemi di decontaminazione (vedi [tabella IV](#)).
- Mantenere gli animali che vengono utilizzati per la sperimentazione separati da quelli che non vengono trattati.
- Riporre i rifiuti solidi contaminati da autoclavare o incenerire in contenitori per rifiuti biologici a tenuta, che devono essere richiusi prima di essere rimossi dal laboratorio.
- Prestare attenzione alle fiale contenenti materiale liofilizzato, il contenuto può essere ad una pressione negativa e l'improvviso ingresso d'aria nella fiala può essere causa di aerosol. Le fiale contenenti materiali infetti non vanno mai immerse in azoto liquido perché se rovinate o mal sigillate possono esplodere quando vengono rimosse. Se sono necessarie basse temperature, le fiale vanno conservate solo nella fase gassosa al di sopra dell'azoto liquido o in congelatori o in anidride carbonica solida (ghiaccio secco). Le superfici esterne delle fiale così conservate devono essere disinfettate quando si rimuovono dal luogo di conservazione.
- Indossare i dispositivi di protezione per gli occhi e per le mani quando si rimuovono le fiale dal luogo di conservazione e refrigerazione.
- Usare la cappa quando si lavora con agenti infettivi, colture cellulari o tessuti potenzialmente contaminati con agenti biologici e/o cancerogeni.
- Avvisare immediatamente il responsabile del laboratorio e seguire le procedure di emergenza, sorveglianza e trattamento medico previste dall'Ente di appartenenza, in caso di contaminazione ed esposizione presunta o manifesta dell'operatore con materiale infetto.
- Applicare la "regola del lavoro in coppia" ovvero nessun individuo dovrà lavorare da solo all'interno del laboratorio quando si opera con agenti pericolosi.

Norme igieniche

- Indossare il camice o indumenti protettivi prima di entrare in laboratorio.
- Le seguenti raccomandazioni possono essere prese in considerazione per la propria salvaguardia durante l'impiego di agenti biologici: non mangiare, bere, fumare, conservare cibo, truccarsi, portare anelli e bracciali o maneggiare lenti a contatto.
- Indossare i guanti quando si lavora con materiale potenzialmente patogeno o contaminato con sostanze tossiche, mutagene o cancerogene.
- Non indossare il camice o indumenti protettivi nella zona destinata al cibo e al di fuori del laboratorio.
- Lavarsi le mani spesso e per almeno venti secondi con sapone neutro dopo aver maneggiato animali o materiali infetti, dopo essersi tolti i guanti e prima di lasciare il laboratorio.
- Riporre i camici o gli indumenti protettivi in una zona separata da quella dove vengono riposti gli abiti personali.
- Lavare i camici o gli indumenti protettivi contaminati separatamente da quelli non contaminati.

Norme per il corretto utilizzo della cappa di sicurezza biologica

- Spegnere la lampada UV o fluorescente, se presente, ed accendere il flusso dell'aria per almeno 5 minuti, prima di iniziare a lavorare sotto cappa.
- Aggiustare il saliscendi, se presente, in relazione alla propria altezza.
- Lavare le mani con sapone neutro ed indossare guanti adatti.
- Disinfettare la superficie interna e posizionare un contenitore per rifiuti in modo che non ostacoli il flusso dell'aria.
- Sistemare l'occorrente necessario in modo da creare una "zona pulita" ed una "zona contaminata".
- Spostarsi sempre dalla "zona pulita" alla "zona contaminata" ed aspettare qualche minuto prima di ricominciare, per stabilizzare il flusso dell'aria.
- Trasferire i rifiuti in apposito contenitore per rifiuti biologici e disinfettare la superficie interna alla fine delle operazioni.

Norme per il controllo della formazione di aerosol

- Usare centrifughe con coperchio di biosicurezza.
- Usare siringhe ad ago autobloccante o bloccabile.
- Riempire lentamente la siringa al fine di ridurre la formazione di bolle d'aria e schiuma nel fluido da inoculare.
- Non usare una siringa per mescolare fluidi infetti ed assicurarsi che solo la punta dell'ago sia immersa sotto il livello del fluido nel contenitore evitando di esercitare una forza eccessiva.
- Avvolgere l'ago e il suo sistema di bloccaggio in un batuffolo di cotone inumidito con disinfettante adatto, prima di estrarre l'ago da un tappo di gomma.
- Espellere il liquido in eccesso e le bolle d'aria dentro ad un batuffolo di cotone inumidito con un disinfettante adatto o in una boccetta contenente cotone sterile tenendo la siringa in posizione verticale;
- Preparare le piastre batteriche sotto cappa; durante tale attività si possono formare aerosol potenzialmente pericolosi in particolare quando si utilizzano agenti patogeni trasmissibili per via aerea.
- Spegnerne la luce UV alla fine dell'esperimento.

Dispositivi di protezione individuale

I dispositivi di protezione individuale (DPI) sono definiti dalla [Direttiva 89/686/CEE](#) come *“qualsiasi dispositivo o articolo destinato ad essere indossato o tenuto da una persona affinché essa sia protetta nei confronti di uno o più rischi che potrebbero mettere in pericolo la salute e la sicurezza”*.

La scelta dei dispositivi di protezione individuale più appropriati può essere fatta solo successivamente all'analisi delle attività da svolgere e dei rischi associati e del grado di protezione necessaria.

Tutti i dispositivi di protezione individuale devono essere indossati prima di iniziare qualsiasi attività considerata a rischio per evitare la contaminazione personale e vanno tolti solo a fine lavoro.

È importante notare che l'operatore che utilizza tali dispositivi deve conoscere bene il loro utilizzo e rendersi conto della necessità di adot-

tare determinati DPI per salvaguardare la propria integrità fisica.

Tutti i DPI devono riportare dichiarazione di conformità CE con la relativa norma EN di riferimento marcata direttamente sul dispositivo forniti di informazioni sul corretto modo di indossarli e i relativi limiti di protezione; alcuni Dispositivi di Protezione Individuale sono soggetti a scadenza pertanto è necessario controllarli accuratamente prima dell'uso.

Guanti

I guanti sono dispositivi atti a proteggere l'operatore da una grande varietà di pericoli tra i quali: sostanze chimiche, caldo, freddo, microrganismi, tossine, materiale radioattivo, morsi e graffi di animali. Non esistono guanti idonei per qualsiasi tipologia di intervento o per proteggere da qualunque rischio; ogni volta dovranno essere indossati guanti adeguati alla tipologia di rischio e il livello di protezione è individuabile dalla norma europea di riferimento.

Per il rischio biologico si utilizzano normalmente guanti monouso in lattice testati al Φ X174 il microrganismo di riferimento per i test relativi la permeazione biologica EN374.

È importante segnalare che fino ad oggi non esistono guanti capaci di dare una protezione assoluta.

I guanti monouso per rischio biologico devono:

- avere marcatura EN374 richiesta per operazioni dove sono prevedibili elevate esposizioni a microrganismi biologici
- non essere indossati per un tempo superiore a 30'
- essere scartati se presentano difetti visibili ad occhio nudo
- essere sempre rimossi quando si esce dall'area di lavoro o si toccano oggetti "puliti"
- mai essere lavati e/o riutilizzati

I guanti sterili dovranno essere usati solo nei casi dove sia strettamente necessario. Si ricorda che il livello di protezione si attenua con il protrarsi del loro utilizzo, infatti il guanto perde le sue proprietà di elasticità e l'effetto della sudorazione delle mani favorisce la permeazione dall'esterno. Al fine di prevenire possibili allergie ogni

qualvolta sia possibile è consigliato utilizzare guanti in nitrile o in vinile, evitando quindi i guanti in lattice.

Per operazioni di pulizia è bene indossare guanti in gomma ispessiti oppure un doppio paio di guanti monouso.

I guanti devono essere indossati anche durante la manipolazione di provette in congelatori o in contenitori di azoto liquido sovrastati da guanti adeguati per la protezione a basse temperature.

Indumenti protettivi

Gli indumenti protettivi proteggono dalla contaminazione gli abiti da lavoro e devono essere indossati quando si svolgono attività con agenti infettivi, sangue o altri liquidi organici o materiali biologici. Devono essere sempre indossati prima di accedere ai laboratori e riposti prima di uscire. Essi devono avere le seguenti caratteristiche:

- essere sufficientemente aerati
- avere l'apertura dietro e i polsini elastici per garantire una protezione adeguata
- essere in cotone per poter essere sterilizzabili
- effettuare un cambio giornaliero quando si opera con microrganismi particolarmente pericolosi
- utilizzare tute monouso testate al $\Phi X174$, copriscarpe, cuffia, mascherina e occhiali quando si compiono operazioni in laboratori con livello di contenimento 3

DPI del viso, degli occhi o delle vie respiratorie

I DPI del viso, degli occhi o delle vie respiratorie devono:

- Limitare il meno possibile il campo visivo e la vista dell'utilizzatore.
- I sistemi oculari di queste categorie di DPI devono avere un grado di neutralità ottica compatibile con la natura delle attività più o meno minuziose e/o prolungate dell'utilizzatore. Se necessario, devono essere trattati o dotati di dispositivi che consentano di evitare la formazione di vapore.
- Si devono utilizzare occhiali con protezioni laterali o visiera

facciale di sicurezza in tutte le operazioni che possono comportare schizzi verso gli operatori come ad esempio l'apertura di contenitori, l'apertura di centrifughe, le operazioni di aspirazione forzata, ecc..

- I DPI per la protezione degli occhi e del volto dovranno avere marcatura EN166.

In caso di schizzi accidentali si devono utilizzare i “lavaocchi” per eliminare prontamente ogni liquido potenzialmente pericoloso.

Maschera Facciale Filtrante FFP3SL

Sono maschere a conchiglia adeguate per la protezione ai microrganismi con granulometria non inferiore a 0,02 .. Deve essere rispondente alla normativa europea EN143.

Bibliografia

- Brun. A., Montero R., Pérez J.A., Romàn M., Manual de Higiene del Trabajo para Técnicos en Prevención de Riesgos Laborales, 2nd Edition, IDEOR, Cámaras de Comercio e Industria, Córdoba. (2001).
- CDC - NIH BioSafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. US Department of Health and Human Services Public Health Service 4 th Edition. Eds. Richmond Y and McKinney R. W. (1999).
- CDC - NIH Guidelines for research on Recombinant DNA Molecules (1976).
- CDC - NIH. Primary Containment for Biohazards: Selection, installation and Use of Biological Safety Cabinets 2 nd Edition. Richmond Y. and McKinney R. W. (2000).
- Freshney R.I. Culture of animal cells. Fanth Edition. Willey - Liss. (2000).
- Manuale di biosicurezza in laboratorio, II Ed., Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. Istituto Superiore di Sanità, (1995).
- Richmond Y. Anthology of Biosafety. II. Facility Design Considerations. American Biological Safety Association, Richmond Y., PhD, Ed. (2000).
- Richmond Y. Anthology of Biosafety. I. Perspectives on Laboratory Design. American Biological Safety Association, Richmond Y., PhD, Ed. (1999).
- Rodricks J.V. Calculated risks Cambridge University Press, Cambridge (1994).

CONTAMINAZIONE ACCIDENTALE CON AGENTI BIOLOGICI

Mariangela Miele, Dimitri Sossai, Silvia Franchello, Paola Bet Rosa Mantero Simò, Modesto Romàn Delgado

In tutti i laboratori si devono stabilire procedure di emergenza da adottare in caso di incidenti (Campi et al., 1998; Manuale di biosicurezza, 1995).

Ogni laboratorio deve definire le norme di sicurezza adatte alle proprie esigenze, in modo tale da rendere operativo quanto previsto dalle normative vigenti e pertanto dovrà essere redatto un piano di emergenza. Il piano di emergenza dovrebbe essere reso noto a tutto il personale programmando appositi corsi di formazione. Il piano d'emergenza deve contenere informazioni su:

- valutazione dei rischi
- localizzazione delle aree a rischio
- identificazione precisa degli agenti biologici chimici e fisici pericolosi
- procedure di emergenza da adottare in caso di esposizioni accidentali e di decontaminazione
- identificazione delle persone a rischio
- identificazione dei responsabili nei diversi settori (responsabile della sicurezza, responsabile del laboratorio, ecc)
- recapiti telefonici delle strutture di pronto intervento
- collocazione del materiale di pronto soccorso, abiti di protezione, disinfettanti, attrezzatura per la decontaminazione
- trattamenti medici d'emergenza in caso di persone contaminate o ferite
- sorveglianza medica delle persone contaminate.

Procedure di emergenza in caso di esposizione accidentale ad agenti biologici

In caso di fuoriuscita di aerosol potenzialmente pericoloso al di fuori

della cappa di sicurezza biologica adottare le seguenti procedure:

- tutte le persone devono immediatamente evacuare l'area contaminata
- il responsabile del laboratorio deve essere immediatamente informato
- attivare le procedure previste dal proprio Istituto
- chiudere la stanza ed applicare sulla porta avvisi di zona contaminata e di divieto di ingresso
- non entrare nel laboratorio per almeno un'ora, per permettere all'aerosol di depositarsi
- indossare indumenti protettivi e protezioni delle vie respiratorie adeguati e procedere alla decontaminazione, sotto la supervisione del responsabile della sicurezza biologica
- consultare un medico se necessario

In caso di spargimento accidentale di materiale liquido contenente agenti biologici adottare le seguenti procedure:

- indossare due paia di guanti
- coprire con un pezzo di stoffa o di carta assorbente imbevuto di disinfettante, e lasciare agire per almeno 30 minuti
- prelevare la stoffa o la carta e il materiale danneggiato con una paletta ed eliminare in appositi contenitori per rifiuti biologici
- maneggiare i frammenti di vetro con pinze
- pulire e disinfettare la superficie contaminata
- autoclavare o immergere per 24 ore nel disinfettante tutto il materiale utilizzato
- copiare le informazioni su un altro foglio e gettare l'originale nel contenitore per rifiuti biologici se si verifica contaminazione di documenti

In caso di rottura o sospetto di rottura di provette contenenti materiale potenzialmente pericoloso durante il funzionamento delle centrifughe adottare le seguenti procedure:

- fermare il motore e lasciare la centrifuga chiusa per almeno 30 minuti
- indossare guanti possibilmente di gomma spessa
- aprire sotto cappa di sicurezza biologica i rotori o i contenitori a tenuta
- recuperare i frammenti di vetro o di plastica usando le pinze
- autoclavare o immergere in un disinfettante per 24 ore tutte le provette rotte, i frammenti di vetro, i contenitori, gli accessori e il rotore; non usare ipoclorito per disinfettare i metalli perché corrosivo
- pulire l'interno della centrifuga e lasciare agire un disinfettante per tutta la notte, quindi lavare con acqua e asciugare
- trattare come rifiuti biologici tutti i materiali contaminati

In caso di iniezioni, tagli e abrasioni accidentali, usare la seguente procedura:

- togliersi i guanti e gli indumenti protettivi
- sciacquarsi le mani e la parte colpita abbondantemente
- applicare un disinfettante adatto per la pelle
- recarsi al pronto soccorso e informare il medico di turno sulla causa della ferita e, se è possibile, fornire informazioni riguardo all'agente microbiologico coinvolto

In caso di ingestione accidentale di materiale potenzialmente pericoloso si devono:

- togliere gli indumenti protettivi e recarsi al pronto soccorso
- informare il medico circa il materiale ingerito

In caso di incidente con agenti biologici pericolosi che si trasmettono per via aerea, oltre ai normali dispositivi di protezione individuale, si devono proteggere le vie respiratorie indossando facciali filtranti del tipo FFP3SL che forniscono protezione contro gli aerosol solidi e liquidi. Quando s'indossa la maschera facciale FFP3SL si devono seguire queste norme:

- tenere il facciale nel cavo della mano, lasciando pendere liberamente la bardatura
- porre il facciale sotto il mento con il sistema stringinaso rivolto verso l'esterno
- portare l'elastico inferiore dietro la nuca sistemandolo al di sotto delle orecchie
- premere il facciale contro il viso con una mano, portare l'elastico superiore dietro la testa sistemandolo al di sopra delle orecchie
- regolare la tensione tirando i lembi di ciascun elastico (la tensione si può ridurre premendo sul retro della fibbia) mentre si tiene in posizione il facciale
- modellare la zona del naso sulla forma del viso, facendo scorrere le dita dalla cima del sistema stringinaso lungo i due lati e premendo contemporaneamente verso l'interno

Inoltre bisogna tenere presente le seguenti avvertenze:

- indossare il facciale e verificarne la tenuta prima di iniziare la preparazione
- indossare il facciale per tutta la durata dell'esposizione ai contaminanti
- eliminare il facciale e sostituirlo con uno nuovo quando l'eccessivo intasamento causa difficoltà respiratoria o disagio, o il facciale subisce danneggiamenti
- utilizzare il facciale solamente per l'uso per il quale è stato fornito
- non utilizzare in atmosfera carente di ossigeno
- i requisiti relativi alla tenuta non sono soddisfatti se capelli o peli di barba passano sotto il bordo di tenuta del facciale
- il facciale può essere utilizzato per un numero di ore corrispondente ad un turno di lavoro (7,30 ore), avendo cura di riporlo in un contenitore sigillato lontano da zone contaminate
- identificare il facciale scrivendo il proprio nome sul coperchietto di plastica posta sopra la valvola di espirazione
- fare sullo stesso, un segno ogni 30 minuti di utilizzo, dopo 15

segni eliminarlo

- sostituire il facciale quando è presente un eventuale intasamento che può causare difficoltà respiratorie o quando è stato danneggiato od è visibilmente sporco

Tutti gli incidenti vanno registrati in modo appropriato, seguendo le istruzioni fornite dal proprio Istituto di appartenenza.

Bibliografia

- Campi M. G., Bet P, Ruzzon T., Doria Miglietta G., Sossai D. Guida al corretto utilizzo degli agenti biologici ed. EPC Libri (1998).
- Manuale di biosicurezza in laboratorio, II Ed., Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. Istituto Superiore di Sanità, (1995).

SPEDIZIONE DI MATERIALI BIOLOGICI DEPERIBILI E/O POTENZIALMENTE INFETTI

Paola Bet, Silvia Franchello

Le attività connesse al trasporto e alla spedizione di materiali biologici deperibili, di campioni diagnostici e di sostanze infette costituiscono un giustificato motivo di preoccupazione per tutti i soggetti interessati, dai ricercatori agli analisti, dal personale dei laboratori a quello addetto ai servizi di trasporto ed ai servizi postali.

Le Organizzazioni internazionali coinvolte nella problematica relativa alla manipolazione e trasporto di materiali biologici e sostanze deperibili (Comitato esperti ONU sulle sostanze pericolose, Organizzazione Mondiale della Sanità, Organizzazione Internazionale dell'Aviazione Civile, Associazione Internazionale Trasporto Aereo, Unione Postale Universale) hanno nel tempo predisposto delle direttive che se da un lato garantiscono la rapidità del trasporto delle sostanze infette e dei campioni biologici, dall'altro si propongono di tutelare non solo la sicurezza della popolazione, ma anche quella dei lavoratori professionalmente esposti.

Queste organizzazioni si sono anche accordate su definizioni comuni e su requisiti di imballaggio ed etichettatura.

Definizioni in vigore dal 1991

- *Sostanze infette*: sostanze che contengono microrganismi vitali, quali batteri, virus, rickettsie, parassiti, funghi, o organismi ricombinanti ibridi o mutati geneticamente, che sono noti o ragionevolmente sospettati di causare malattie nell'uomo o negli animali. In questo gruppo non sono incluse le tossine.
- *Campioni diagnostici*: materiali umani o animali, ad esempio escreti, secreti, sangue e suoi componenti, tessuti e fluidi dei tessuti, che vengono spediti a scopo diagnostico. Non fanno parte di questa categoria gli animali infetti vivi.
- *Prodotti biologici*: possono essere prodotti biologici finiti per uso umano o veterinario, fabbricati in ottemperanza alle norme delle autorità nazionali e che viaggiano con speciale approva-

zione o licenza di queste autorità; oppure prodotti biologici finiti spediti prima dell'ottenimento della licenza per scopi di sviluppo e studio. Ne fanno parte anche prodotti biologici non finiti preparati secondo le procedure di agenzie governative specializzate. I vaccini vivi, animali e umani, sono considerati prodotti biologici e non sostanze infette.

Preparazione delle confezioni per la spedizione di agenti biologici

Per le sostanze infette e i campioni diagnostici probabili fonti di sostanze infette, è richiesto un triplo imballaggio in accordo con le raccomandazioni delle Nazioni Unite, della IATA e dell'ICAO.

Pertanto la preparazione delle confezioni deve essere eseguita nel rispetto delle seguenti procedure:

- Le sostanze infette e il materiale diagnostico dovrebbero essere posti in un imballaggio a tre strati: un primo contenitore a tenuta stagna contenente il campione, un secondo recipiente, anch'esso a tenuta stagna, separato dal primo per mezzo di uno strato di materiale assorbente, in quantità sufficiente a trattenere i liquidi presenti nel campione in caso di eventuale fuoriuscita, un imballaggio esterno protettivo ed impermeabile, che permetta di evitare danneggiamenti da parte di agenti fisici o dell'acqua.
- Sull'esterno del secondo contenitore deve essere applicata, in modo che non sia facilmente asportabile, una scheda con i dati identificativi del contenuto; una copia di questa scheda dovrà essere immediatamente trasmessa al laboratorio destinatario, mentre una terza deve essere consegnata al responsabile della spedizione. In tal modo gli addetti, sia al trasporto che alla ricezione, saranno in grado di adottare tutte le precauzioni necessarie.
- Sull'imballaggio esterno dei colli contenenti sostanze infette o potenzialmente tali deve essere apposta un'etichetta con il simbolo di rischio biologico.
- Se il confezionamento del pacco prevede la presenza di materiali quali azoto liquido o ghiaccio secco, devono essere scelti contenitori e imballaggi resistenti a temperature molto basse; inoltre il primo e il secondo contenitore dovranno poter sostenere

una pressione differenziale di almeno 95 kPa.

- Se la sostanza è deperibile deve essere segnalato sui documenti di accompagnamento.

Spedizione dei pacchi

Per essere efficiente, il trasferimento delle sostanze infette richiede un buon coordinamento fra il mittente, il trasportatore e il laboratorio destinatario.

Pertanto le sostanze infette non devono essere spedite senza preliminare accordo fra questi tre interlocutori, o prima che il destinatario abbia avuto conferma dalle autorità nazionali sulla possibilità di importare tali sostanze legalmente e che quindi non vi sarà alcun ritardo nella consegna a destinazione del pacco.

Il mittente dovrà pertanto seguire le seguenti procedure:

- Prendere accordi in anticipo con il trasportatore e il destinatario per assicurarsi che il campione venga ricevuto e analizzato prontamente.
- Preparare i documenti di spedizione.
- Informarsi del percorso del viaggio.
- Inviare una comunicazione tempestiva di tutti i dati di spedizione al destinatario.

È responsabilità del destinatario:

- Ottenere le autorizzazioni dalle autorità nazionali per l'importazione delle sostanze.
- Fornire al mittente i permessi di importazione necessari, le lettere di autorizzazione, o altri documenti richiesti dalle autorità nazionali del paese d'origine dei campioni.
- Notificare immediatamente al mittente l'avvenuta ricezione.

Bibliografia

- Guidelines for the Safe Transport of Infectious Substances and Diagnostic Specimens, The World Health Organization (WHO) (1997).

SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Modesto Román Delgado, Rosa Montero Simó

La sperimentazione con animali da laboratorio implica il contatto con vertebrati i quali, per motivi diagnostici o di ricerca, possono essere trattati con agenti biologici. Inoltre implica lo studio dei processi patologici scatenati nell'animale esaminato al fine di trovare la causa e la cura corretta per una determinata malattia.

Lo stabulario è una struttura autorizzata dall'autorità competente del proprio paese per poter ospitare e utilizzare animali a fini sperimentali. Il personale che si occupa degli animali deve avere le sufficienti informazioni per poter lavorare con essi in condizioni di sicurezza, deve conoscere i livelli di rischio del gruppo degli agenti biologici utilizzati e saper applicare le eventuali misure di contenimento.

Proteggersi contro le patologie delle specie animali, siano esse latenti o conclamate, è una misura precauzionale obbligatoria per quanto riguarda il rischio biologico.

A causa della grande varietà di specie animali utilizzate nella ricerca, gli stabulari devono adattarsi ad ognuna di esse. Ci sono tre differenti tipi di stabilimenti, in virtù della Decisione del Consiglio [1999/575/CE del 23 Marzo 1998](#) in riferimento alla Convenzione Europea per la protezione degli animali vertebrati utilizzati nella ricerca e per altri scopi scientifici (OJ EC 24, Agosto 1999). Essi sono:

- Stabilimenti per la riproduzione, dove gli animali sono allevati con l'intento di mantenerli prima di darli all'utilizzatore finale.
- Stabilimenti di rifornimento, dove gli animali sono allevati al solo scopo di rifornire altri stabilimenti che poi ne faranno uso per la ricerca.
- Stabilimenti di utilizzo, dove gli animali sono impiegati nelle sperimentazioni-scientifiche.

La lista, anche se incompleta, delle specie animali utilizzate nella

ricerca include:

- Topi (*Mus musculus*).
- Ratti (*Rattus norvegicus*).
- Cavie (*Cavia porcellus*).
- Criceti (*Mesocricetus auratus*).
- Conigli (*Oryctolagus cuniculus*).
- Quaglie (*Coturnix coturnix*).
- Maiali (*Sus scrofa familiaris*), preferibilmente la specie pig mic.
- Cani (*Canis familiaris*), soprattutto i beagles.
- Gatti (*Felix Catus*).
- Primati, incluso: scimpanzè, mandrilli, rhesus, scimmie africane, mangabey, titi, ecc.

Per poter elaborare adeguate procedure sperimentali è necessario conoscere le caratteristiche anatomiche, fisiologiche e genetiche più importanti degli animali che si pensa di utilizzare, le condizioni ambientali per loro ottimali ed anche le caratteristiche che essi dovrebbero avere per il loro uso come modelli sperimentali.

Un obiettivo importante nella formazione del personale degli stabulari è quello di far conoscere i rischi che il lavoro con animali può comportare e le adeguate misure per la prevenzione di tali rischi.

In uno stabulario i principali fattori di rischio sono rappresentati da:

1. animali:

- allergie
- trasmissione di zoonosi
- aggressività ed eventi traumatici (morsi e graffi)
- presenza di materiale biologico

2. condizioni ambientali

3. tipo di procedure

4. condizioni fisiologiche del personale

I danni più frequenti sono:

- allergie causate da allergeni di origine animale
- processi infettivi causati da patogeni animali (zoonosi)
- morsi, graffi ed altri incidenti causati dagli animali
- danni causati da uso improprio del materiale e delle strumentazioni

La maggior parte delle specie animali destinate alla ricerca sono potenziali fonti di microrganismi patogeni. Gli animali presenti in stabulario dovrebbero sempre avere una certificazione sanitaria che attesti l'assenza di agenti patogeni zoonotici. Il personale di laboratorio comunque deve attenersi a procedure precauzionali per scongiurare eventi dannosi. Infatti possono essere presenti rischi che derivano dal quotidiano contatto fisico con gli animali, come pure dalle varie attività di laboratorio tra cui campionamento di sangue, interventi chirurgici, attività di necropsia o manipolazione di materiale biologico a rischio correlato all'animale.

Il certificato sanitario dell'animale che entra in stabulario deve contenere una dichiarazione che gli animali siano esenti da:

- Roditori: virus della coriomeningite, hantavirus, micosi, tubercolosi.
- Primati non umani: tubercolosi, encefalite, malattia di Malburgo, febbre gialla.
- Ovini, bovini e suini: brucellosi, tubercolosi.
- Gatti e cani: parassiti, rabbia (certificato di vaccinazione).

Il rischio biologico non può essere calcolato ed è molto difficile poter definire una linea di "prevenzione". È necessario pertanto controllare tutte le possibili variabili per poter definire l'appropriato "livello di biosicurezza" attraverso la selezione degli animali compiendo accurati controlli ed applicando le appropriate misure preventive.

Nel valutare il rischio biologico che deriva dalla trasmissione di materiale patogeno dagli animali utilizzati per sperimentazioni (ospiti), devono essere considerate alcune caratteristiche:

- Caratteristiche degli agenti infettivi (virulenza, stabilità biologica, ecc).
- Caratteristiche delle malattie (gravità, disponibilità di immunoprofilassi e cura).
- Modalità di eliminazione dell'agente patogeno da parte dell'animale (escrementi, urine, saliva, aerosol, ecc).
- Modalità di trasmissione (aerosol, vettori, ecc).
- Potenziale pericolo legato alla manipolazione (siringhe, tagli, contatto, aerosol).

Lavorare con gli animali può essere causa di ferite come morsi e graffi, che possono essere evitati mediante:

- Somministrazione di sedativi agli animali, quando possibile.
- Uso di gabbie provviste di sistemi di immobilizzazione per gli animali di grandi dimensioni.
- Conoscenza delle tecniche di immobilizzazione.
- Uso degli appropriati guanti protettivi.

Inoltre alcuni lavoratori possono essere allergici a certi animali e c'è la possibilità di un'esagerata e inappropriata risposta immunitaria. Tutto ciò può essere causa scatenante di un processo allergico considerato una vera e propria malattia professionale.

Un laboratorio nel quale hanno luogo esperimenti su animali deve essere strutturato in modo da garantirne l'efficienza, la funzionalità dal punto di vista sanitario e permettere la cura e la sorveglianza degli animali. Il progetto di tale laboratorio deve essere principalmente basato sull'applicazione di precise procedure di sicurezza microbiologica in modo da garantire i migliori risultati e le condizioni ottimali di mantenimento degli animali.

Ogni operazione dovrebbe essere adeguatamente pianificata, in base alle attività che si dovranno svolgere (allevamento, test tossicologici, ricerca biomedica, ecc.), anche se per ognuna di queste attività è bene che gli animali siano tenuti in condizioni ambientali costanti, in assenza di agenti fisici, chimici e microbiologici. Devono inoltre essere presenti delle aree di servizio, aree per gli animali e zone di interconnes-

sione o corridoi che garantiscano una corretta circolazione di personale, animali, materiale ed apparecchiature.

Un laboratorio nel quale hanno luogo esperimenti su animali deve essere dotato almeno delle seguenti strutture:

- area per la riproduzione e l'allevamento degli animali
- area per la sperimentazione animale
- locali e strutture di supporto
- area di quarantena e aree di lavaggio delle gabbie
- area per uffici

Le zone di riproduzione degli animali dovrebbero essere fisicamente separate dalle aree dedicate al personale in modo da garantire la sicurezza per la salute pubblica, il benessere del personale ed il controllo delle regole ambientali. Tutte le operazioni di laboratorio che riguardino gli animali dovrebbero tener conto delle appropriate condizioni di vita per l'animale (una certa libertà di movimento, acqua e cure specifiche, minime restrizioni per i loro bisogni fisiologici, ecc) e delle procedure di ricerca, che dovrebbero garantire il raggiungimento degli obiettivi prefissati cercando di evitare o quanto meno ridurre possibili sofferenze per gli animali. Inoltre, i laboratori che usano animali dovrebbero unire l'organizzazione strutturale con le risorse tecniche e l'addestramento del personale, in modo da permettere un corretto svolgimento delle metodiche di ricerca.

Le varie aree dovrebbero essere collocate nell'edificio a seconda delle necessità, ad esempio potrebbe essere necessario collocare un'area in prossimità di un laboratorio tenendo conto anche della struttura dell'edificio stesso. Gli stabulari dovrebbero essere collocati in un piano indipendente; tuttavia in alcuni casi possono occupare diversi piani purché questi siano collegati da un ascensore dedicato utilizzabile solo dal personale. In alternativa è anche possibile creare più unità indipendenti sotto un controllo centrale ed avere gabbie per animali situate in parti diverse dell'edificio.

Comunque, gli stabulari dovrebbero rispettare i seguenti requisiti in modo da garantire condizioni di lavoro ottimali per il personale e appropriate condizioni di vita per gli animali:

- Avere superfici di lavoro robuste e lavabili.
- Avere pavimenti solidi, resistenti alle macchie e agli agenti chimici, anti-scivolo, senza giunzioni, pur con un aspetto estetico adeguato senza necessità di utilizzare prodotti lucidanti o cere; avere i sifoni degli scarichi dei pavimenti contenti acqua; questi dovranno essere regolarmente lavati e disinfettati.
- Essere provvisti di muri senza ringhiere protettive, resistenti agli urti dei carrelli ed eventuali altri dispositivi mobili; privi di fessure e resistenti agli oggetti che vi sono appoggiati, alle spazzole, ai prodotti disinfettanti ed alla pressione dell'acqua; i possibili fori nei muri dovrebbero essere sigillati, così come le superfici di giunzione dei pavimenti e dei soffitti, che dovrebbero avere una curvatura di 15 cm.
- Avere soffitti con le stesse caratteristiche dei muri, quelli fatti di lastre ad incastro non sono consigliabili perché non sono pulibili con semplicità e possono costituire un facile nascondiglio per insetti e roditori. È inoltre consigliabile non lasciare tubature o attrezzature scoperte; se presenti quest' ultime devono poter essere facilmente lavate e disinfettate. Salvo speciali richieste, l'altezza dei soffitti dovrebbe essere non superiore a 2.70 m.
- Essere provvisti di porte ad apertura verso l'interno, a meno che non ci sia un'anticamera, con le cerniere delle porte, incassate nel muro e a chiusura automatica. Le porte degli stabulari non dovrebbero avere dimensioni minori di 1.10 m di larghezza e 2.15 m di altezza e devono poter essere chiuse ermeticamente, in modo da impedire ad insetti o a roditori selvatici di introdursi nelle gabbie; sono da preferirsi porte in metallo con delle strisce protettive applicate sulla parte bassa e lungo i bordi e dotate di una finestrella per poter controllare le gabbie senza entrare nello stabulario.
- Avere, nel magazzino, porte di dimensione adatta per permettere il passaggio dei mezzi di trasporto, a chiusura automatica in caso di allarme antincendio; nelle aree di maggior traffico sono da preferirsi larghe porte automatiche (1.80 m) (ad es. in aree per il lavaggio delle gabbie, aree dedicate agli animali in arrivo ed in partenza).

- Avere corridoi larghi almeno 2.10 m, liberi da oggetti e/o ringhiere protettive, con bordi in acciaio o altro materiale resistente.
- Essere dotati di ascensori ad utilizzo esclusivo dei laboratori e sufficientemente spaziosi da poter contenere 3-5 tipi differenti di gabbie; possedere, possibilmente, ascensori diversi per le gabbie sporche, per quelle pulite e per i rifornimenti.
- Essere dotati di una o più prese della corrente elettrica, con un potenza minima di 200 W, in ogni stanza o cella; le zone di servizio dovrebbero essere dotate di un quadro elettrico generale a cui collegare tutte le apparecchiature e dovrebbe essere presente un gruppo elettrogeno capace di attivarsi automaticamente in caso di un'eventuale interruzione dell'erogazione elettrica dalla rete principale.
- Possedere prese e tubi fluorescenti sigillati, o situati ad almeno 10 cm dal soffitto, in modo da poterli pulire; è necessario installare un sistema di illuminazione automatica in modo da regolare i ritmi di luce giornalieri in ogni stanza.
- Avere, nelle aree in cui abitualmente si usano manichette per la pulizia e la decontaminazione, i pavimenti con un'inclinazione di almeno 0.64 cm/m; nelle aree dove soggiornano i cani, l'inclinazione dovrebbe essere di 0.64/0.3 cm/m.
- Possedere scarichi nei pavimenti a livello del pavimento e con un diametro di almeno 10.2 cm, 15.3 cm nelle aree dove si lavano abitualmente le gabbie e dove stazionano i cani; gli scarichi utilizzati solo occasionalmente dovrebbero essere dotati di un coperchio ed essere sigillati in modo da evitare la fuoriuscita di eventuali gas.
- Essere dotato di sistemi di comunicazione, come i telefoni, che non disturbino gli animali (segnale di chiamata luminoso o a vibrazione).
- Avere una buona ventilazione; se la ventilazione è meccanica, l'aria deve essere inviata dall'atmosfera e il flusso d'aria all'interno deve essere regolare e continuo, senza turbolenze.
- Possedere aree di contaminazione separate (aree di isolamento e dei residui) da quelle pulite (aree per le pause di lavoro e per il

lavoro di amministrazione); il limite di accesso deve essere chiaramente indicato sulle porte.

Per il notevole valore delle sperimentazioni su animali e la possibilità di atti vandalici sono richieste specifiche misure di sicurezza. Queste misure dipendono da come sono strutturati i laboratori e dalla loro posizione nell'edificio:

- Gli impianti dovrebbero essere isolati e le porte chiudersi automaticamente quando necessario.
- Nei laboratori dovrebbe entrare solo il personale autorizzato e munito di un codice di identificazione.
- È consigliabile utilizzare serrature in modo da limitare l'accesso ai laboratori, alle aree di quarantena e a quelle dedicate all'allevamento degli animali.
- È opportuno praticare tacche nelle orecchie degli animali eseguite con speciali pinze. Questa procedura dovrebbe essere registrata con un codice speciale. È sconsigliata l'amputazione delle falangi.
- Gli animali possono inoltre essere dotati di particolari targhette di plastica o metallo recanti numeri o lettere di identificazione. Questa metodica è sconsigliata nel caso dei roditori.
- Possono essere effettuati tatuaggi su zone chiare della pelle (orecchie o coda) usando penne elettroniche o particolari pinze marcatrici.
- Possono inoltre essere iniettati microchips sottocutanei costituiti da un materiale biocompatibile, a questo scopo dovrebbe essere utilizzata una siringa. Gli animali potranno così essere identificati mediante uno speciale apparecchio.

La cura degli animali consiste in una serie di operazioni quotidiane come ricevere gli animali, pulire le gabbie, eliminare i rifiuti, ecc, che possono essere pericolose per la salute e la sicurezza del personale in relazione ai materiali e agli animali utilizzati. Per queste operazioni di routine bisognerebbe porre attenzione ai seguenti aspetti:

- Il cibo dovrebbe essere preparato con attenzione in modo da evitarne l'inalazione. Le cibarie dovrebbero essere impacchettate in sacchetti di almeno 25 kg.
- Le gabbie, le rastrelliere delle gabbie e l'attrezzatura connessa, come i dispositivi per l'alimentazione e per l'acqua, dovrebbero essere regolarmente puliti e sterilizzati, soprattutto quando si utilizza cibo fresco o quando possono essere contaminati dalle urine o da escrementi. In questi casi dovrebbero essere puliti ogni giorno.
- Le gabbie e le attrezzature possono essere lavate a mano con acqua (per immersione o con la manichetta dell'acqua), con detersivi, spazzole, disinfettanti chimici, ecc.; il personale dovrebbe indossare un equipaggiamento protettivo (calzature in gomma e grembiuli resistenti all'acqua).
- Per proteggersi dagli schizzi d'acqua e dai prodotti chimici (ipoclorito, fenolo, ammoniaca, formaldeide, ecc.) gli operatori dovrebbero seguire le seguenti norme:
 - leggere attentamente le istruzioni indicate sia sull'etichetta che nelle schede di sicurezza dei prodotti
 - maneggiare i prodotti volatili sotto cappa aspirante
 - indossare guanti, occhiali di protezione o maschere quando si lavora con materiale corrosivo o pericoloso; le lenti a contatto sono sconsigliate
- Sarebbe opportuno utilizzare sistemi di abbeveraggio automatici.
- È essenziale sterilizzare le gabbie e tutte le attrezzature in autoclave o con prodotti chimici, in modo da mantenerli sempre in condizioni ottimali per le sperimentazioni. I materiali o le apparecchiature per la sterilizzazione dovrebbero essere regolarmente controllati e calibrati in modo da garantirne l'efficacia e la sicurezza. Il personale dovrebbe essere informato dei rischi connessi al loro uso (ustioni, intossicazioni, reazioni cutanee, ecc.).
- Le lettiere sporche dovrebbero essere rimosse e sostituite in modo da mantenere gli animali in un ambiente asciutto e pulito. La frequenza secondo cui si effettuerà questa mansione dipende da di-

versi fattori tra cui il numero e la taglia degli animali, il tipo e la qualità del materiale e sono consigliabili pompe aspiranti per rimuovere urine, escrementi e microrganismi al fine di impedire la produzione di pulviscolo aereo e il conseguente rischio di inalazione.

- I rifiuti rappresentano un problema importante. Gli animali morti fanno parte di questi rifiuti. I laboratori che utilizzano animali dovrebbero essere dotati di un inceneritore o altrimenti dovrebbe esserci un'area dedicata allo stoccaggio dei rifiuti con degli speciali congelatori per gli animali morti. I contenitori dei rifiuti dovrebbero essere resistenti agli strappi e dotati di chiusure ermetiche. Personale specializzato dovrebbe occuparsi dello smaltimento dei rifiuti.
- In caso di incidenti sul lavoro, anche se trattasi solo di morsi o graffi, è opportuno che il personale incaricato raccolga tutte le informazioni riguardanti l'accaduto.

Il personale che ha il compito di lavorare a contatto con gli animali dovrebbe seguire corsi specializzati in modo da avere tutte le informazioni utili sulle tecniche più adatte da adottare durante il loro lavoro. In questo modo si potrebbe salvaguardare non solo il benessere degli animali, ma anche la buona riuscita delle procedure sperimentali.

Una delibera del Consiglio d'Europa del 3 Dicembre 1993, ha stabilito le classificazioni del personale che debba lavorare a contatto con gli animali, in base alle categorie, ai requisiti di capacità standard e specifici. Questo tipo di personale è diviso in quattro gruppi:

Classe A: Persone addette alla cura degli animali.

Classe B: Persone che rendono operative le procedure.

Classe C: Persone addette alla direzione ed elaborazione delle procedure.

Classe D: Specialisti della ricerca su animali.

Queste categorie sono state definite in base alle mansioni che il personale deve svolgere, e lo specifico addestramento dovrebbe essere fornito in accordo con le leggi e regolamentazioni che il loro lavoro

comporta. Tuttavia, ogni persona coinvolta dovrebbe ricevere un appropriato insegnamento focalizzato a mantenere sicuro l'ambiente di lavoro che comprende informazioni su:

- I possibili pericoli associati.
- Le conseguenze di un non corretto uso di materiale, attrezzature e prodotti chimici.
- Addestramento su come maneggiare gli animali.
- Attrezzature e dispositivi di protezione individuali: gli abiti da lavoro dovrebbero essere lavabili e resistenti alle alte temperature, le calzature comode e preferibilmente lavabili e si dovrebbero indossare guanti e maschere quando si lavano le gabbie e per tutte le operazioni che comportano produzione di polveri respirabili. I Dispositivi di Protezione del personale devono essere tenuti in un posto specifico, mantenuto pulito e sostituito quando necessario.
- Igiene personale:
 - Il personale deve farsi la doccia dopo il lavoro.
 - Gli operatori devono lavarsi le mani e cambiarsi d'abito prima dei pasti e alla fine della giornata di lavoro.
 - Gli abiti da lavoro devono essere lavati quotidianamente.
 - Il personale dovrebbe evitare di ferirsi e quando capita coprire immediatamente i tagli.
- Buone pratiche di laboratorio:
 - Non mangiare né bere nel laboratorio e non fumare.
 - Non toccarsi il naso o il viso mentre si lavora in laboratorio.
- Norme di pronto soccorso:
 - Il personale dovrebbe essere in grado di utilizzare il kit di pronto soccorso, che dovrebbe essere ben visibile e contenere: sapone, siero, aghi sterili e siringhe, acqua ossigenata, iodio, tamponi di cotone, cerotti, garze e bende sterili, analgesici, forbici, un paio di pinzette ed un bisturi.
 - Il personale dovrebbe essere a conoscenza del trattamento base delle ferite:
 - ◆ Lavare con acqua e usare il sapone quando necessario.
 - ◆ Applicare il siero ed eliminare corpi estranei con le pinzette, le forbici o il bisturi.

- ◆ Applicare un disinfettante.
- ◆ Coprire la ferita.

La valutazione dei rischi che comporta il lavoro a contatto con animali dovrebbe tenere conto delle condizioni fisiche e psichiche del personale. A questo scopo sarebbe utile programmare un controllo medico al fine di:

- Identificare il personale a rischio: persone con diminuzione delle difese immunitarie, donne in stato di gravidanza, persone maggiormente sensibili alla contaminazione (per esempio per ferite cutanee) o ad infezioni, persone allergiche agli animali e alle sostanze ad essi connesse, (come persone che soffrono di asma o riniti) e persone predisposte agli allergeni.
- Proteggere gli animali dai parassiti tipici della loro specie, non accettare animali affetti da micosi, tubercolosi, portatori di salmonella o amebe, ecc., in modo da non spargere zootossine nel laboratorio.
- Vaccinazioni obbligatorie e immunizzazioni dopo incidenti e specifiche chemiopprofilassi.
- Valutare le condizioni psicologiche del personale che dovrà lavorare con animali come gatti, cani e primati. Aver paura degli animali o tenere un comportamento aggressivo significa aumentare il rischio di incidenti. È da tenere in considerazione anche la possibilità di affezionarsi agli animali, questo comportamento potrebbe ostacolare il lavoro di ricerca.
- Monitorare, attraverso controlli con frequenza almeno annuale, la salute del personale e possibili contaminazioni da zootossine.

Il lavoro a contatto con gli animali implica il rischio di infezioni. Questo tipo di rischio ha delle caratteristiche particolari, differenti da quelle del pericolo di tipo chimico e fisico, perché non è possibile sapere se un animale sia infetto o no senza effettuare delle analisi. Ci sono molti agenti biologici che non attaccano gli animali. Inoltre non si sa molto su come avvenga la trasmissione dei germi patogeni, non esiste una relazione dose-effetto. È una reazione tipo “tutto o niente”: o

sono infettati tutti o nessuno. Gli effetti di un'infezione patogena non sono prevedibili, dipendono dal singolo. In più questi agenti possono mutare, specialmente i virus, possono cambiare la loro struttura e patogenicità.

Tuttavia è possibile applicare criteri di sicurezza e tutela della salute del personale in modo da supportare le norme comportamentali di base dei laboratori dove si lavora a contatto con gli animali.

Bibliografia

- Blanchin, N., Abadia, G., Leprince, A., Risques infectieux liés à la matenance et à la manipulation des animaux de laboratoire pour le personnel travaillant dans les animaleries, Documents pour le medicine du travail, INRS, 53, 1998, 3-23.
- Brun, A., Montero, R., Perez, J.A., Roman, M., Manual de Higiene del Trabajo para Técnicos en Prevención de Riesgos Laborales, IDEOR, Córdoba, 2000, 308
- Costela, C., Manejo, marcaje e identificación de animales, II Curso de formación avanzada en protección y experimentación animal, Córdoba, 2000.
- Hospital General de Valencia, Animales de laboratorio más utilizados. Características fundamentales, Research in Surgery, sup.1, 1989, 3-19.
- Hospital General de Valencia, Líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de animales, Research in Surgery, sup.1, 1989, 25-36.
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 2ª Edición, O.M.S., Ginebra, 1994, 149 p.
- Martí, M.C. et al., Prevención de Riesgos Biológicos en el Laboratorio, I.N.S.H.T., 1997, 169 p.
- Luque, I., Los roedores en experimentación animal: enfermedades infecciosas y zoonosis transmisibles, II Curso de formación avanzada en protección y experimentación animal, Córdoba, 2000.
- Martín, J., Unidades de producción y/o experimentación. Construcción-distribución de locales y áreas funcionales. Tipo de establecimientos., II Curso de formación avanzada en protección y experimentación animal, Córdoba, 2000.
- Tarradas, C. et al., Zoonosis transmitidas por animales de experimentación. I parte, Información Veterinaria, 7, 2000, 39-47.

RISCHIO CHIMICO

SOSTANZE CHIMICHE NEI LABORATORI DI BIOTECNOLOGIA

Andrè Picot

Introduzione

Le *sostanze chimiche* non sono usate soltanto dai chimici; molti biologi possono avere necessità di usarle continuamente, nella biologia di base o in campi applicati come le biotecnologie.

Una *sostanza chimica* può essere *fonte di pericolo*, i *relativi rischi* devono essere controllati in modo da aumentare la qualità e la *sicurezza* delle *attività di laboratorio*.

La *sicurezza* è associata ad un'*alta qualità del lavoro*, pertanto è importante conoscere precisamente i rischi relativi alle sostanze chimiche che devono essere utilizzate in laboratorio.

In *biologia*, come in *chimica* o *fisica*, ogni volta che si intende lavorare con *sostanze chimiche* si deve prima di tutto prendere in considerazione la *valutazione e la prevenzione dei rischi*, che possono essere di tipo chimico-fisico, chimico o ambientale.

Nel settore dei rischi relativi alle sostanze chimiche, il '*linguaggio*' è così importante che sarà fornita una breve rassegna dei termini più importanti.

Come si definisce una sostanza chimica?

In *chimica*, la più piccola forma individuata è l'*atomo*. Gli atomi possono essere associati per formare strutture più complesse: *le molecole*.

L'*ambiente biologico* è principalmente l'*acqua* (75 % per l'uomo); così gli *atomi* agiscono come *ioni caricati* negativamente o positivamente.

mente, cosa che corrisponde ad un guadagno o ad una perdita di uno o più elettroni nel suo strato periferico.

I *cationi* sono *ioni caricati positivamente* e gli *anioni negativamente* come rappresentato nella figura 1.

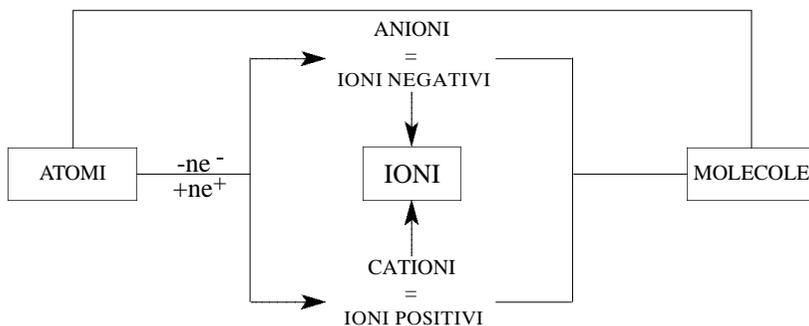


Figura 1. Da atomi e ioni a molecole

A partire da Lavoisier (1743-1794), uno dei fondatori della chimica, si distinguono *composti minerali* (dal mondo minerale) e *composti organici* (scoperti negli organismi viventi). I composti organici hanno come costituente principale il *carbonio* e l'atomo di carbonio è *legato a sè stesso* (C-C) o all'*idrogeno* (C-H), come negli *idrocarburi*, la famiglia di composti organici più semplice.

Le sostanze chimiche (*atomi, ioni o molecole*) possono mostrare una maggiore o minore *reattività chimica* che è essenziale e deve essere presa in considerazione.

L'*acido nitrico concentrato* è altamente *nitrante* (in grado di portare uno o più nitrogruppi in una molecola) e fortemente ossidante (in grado di trasformare una molecola per ossidazione). Ad esempio, scaldare fino alla fusione un prodotto minerale molto reattivo come l'acido nitrico concentrato con un *prodotto organico facilmente ossidabile* come un *alcool* (metanolo, etanolo glicerolo) è pericoloso e porterà ad una esplosione seguita da un incendio!

Si deve in particolare fare attenzione alla *conservazione delle sostanze chimiche*: bisogna evitare di mettere vicini prodotti *incompatibili* che insieme sono *molto reattivi*.

A tutt'oggi più di *21 milioni di sostanze chimiche* sono elencate nel Chemical Abstract (CAS on line, Gennaio 2001) fra le quali 100.000 sono correntemente utilizzate ed in procinto di essere *classificate* dall'Unione Europea.

Ovviamente, molte delle sostanze chimiche usate nelle biotecnologie sono sotto questa *classificazione*. Nondimeno occorre fare molta attenzione nell'uso di reagenti più o meno sofisticati in quanto il loro reale comportamento non è conosciuto e il loro impatto sulla salute dell'uomo non è stato ancora studiato.

Le sostanze chimiche, proprietà e rischi

Per un *esperimento di laboratorio*, la *sicurezza* dipende dall'*uso di strumentazioni adeguate*, dal tipo di prodotti chimici e dalle *condizioni di utilizzo*.

Al fine di valutare i rischi, parecchi parametri devono essere presi in considerazione: *proprietà fisico-chimiche, reattività, danno alla salute* (umana o tossicità veterinaria) o all'ambiente (ecotossicità): figura 2.

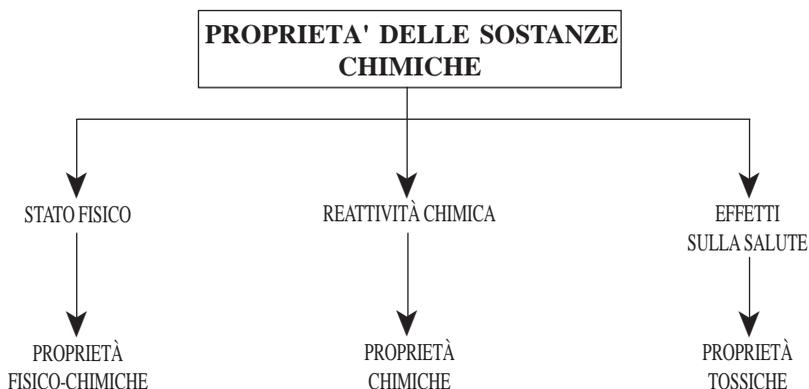


Figura 2. Principali proprietà delle sostanze chimiche

A. PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE E RISCHI ASSOCIATI

Le *proprietà fisico-chimiche* dipendono dallo *stato fisico* del prodotto: *gassoso* (o fase vapore) *liquido* o *solido*.

Forme particolari come gli *aerosol* (solidi o liquidi finemente suddivisi in sospensione nell'aria) sono da tenere nella dovuta considerazione in quanto entrano nell'organismo molto velocemente attraverso l'apparato respiratorio. L'uso di reagenti sotto forma di spray può presentare considerevoli rischi a seconda della natura del prodotto polverizzato.

Ad esempio, l'*acido solforico concentrato* sotto forma di spray è un potente cancerogeno bronco-polmonare per l'uomo.

Il *rischio chimico-fisico* dipende da un lato dalle *proprietà fisico-chimiche* come l'*instabilità*, l'*infiammabilità*, la *volatilità* e dall'altro lato dalla *reattività chimica* ovvero dalla capacità delle sostanze di reagire con se stesse o con altre.

Esplosione, incendio e alcuni *rischi tossicologici* (relativi a sostanze chimiche direttamente tossiche la cui reattività è sufficiente a permettere l'interazione con i costituenti biologici) sono dipendenti dalle *proprietà fisico-chimiche* come indicato nel figura 3.

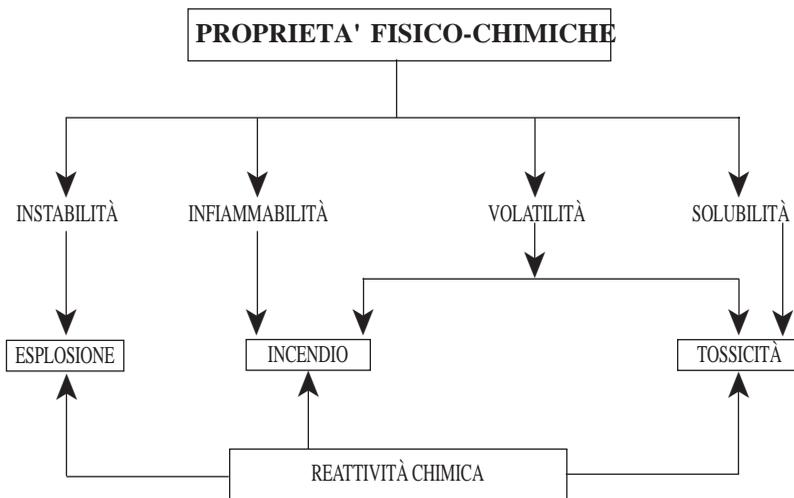


Figura 3. Principali rischi associati alle sostanze chimiche

1. Rischio relativo all'instabilità chimica

L' *instabilità* di una sostanza chimica o di una miscela può condurre a due generi di incidenti:

- *esplosione*
- *incendio*

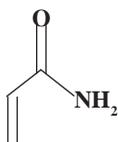
Esplosione ed *incendio* sono i *rischi maggiori*, spesso molto distruttivi per le strutture e per gli operatori coinvolti in questi incidenti.

Il *rischio di esplosione* dipende da tre parametri:

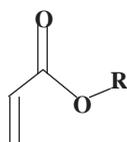
- *stabilità* dei composti
- *reattività*
- *dominio di esplosività* che è situato tra il *limite inferiore di esplosività* (Lower Explosivity Limit, LEL) e il *limite superiore di esplosività* (Upper Explosivity Limit, UEL). LEL e UEL sono riportati nelle tabelle successive

In *chimica* le *fonti di esplosione* sono molto numerose. In un *laboratorio di biologia* esse sono limitate all' *uso imprudente di prodotti o miscele instabili* o ad operazioni pericolose come la *brutale polimerizzazione di monomeri*, usati nelle inclusioni e nei gel.

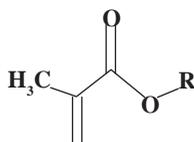
Alcune sostanze chimiche possono reagire tra di loro: è il caso di alcuni *monomeri organici* la cui *polimerizzazione* può essere violenta. Pertanto è meglio *non lavorare su quantità elevate* di sostanze chimiche come l' *acrilamide* (usata per fare gel di poliacrilamide), gli *acrilati* (o metacrilati), gli epossidi, che sono usati per preparare delle resine.



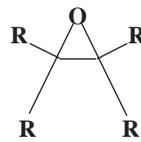
Acrilamide



Acrilati



Metacrilati



Epossidi

Alcuni monomeri così come l'*acrilamide* o lo *stirene* polimerizzano con una violenta reazione quando vengono *scaldati*. Ma di solito, la polimerizzazione è iniziata da *tracce di impurità* (acidi, basi, perossidi, metalli...).

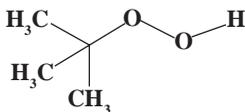
I *monomeri* devono essere conservati in *piccole quantità* dopo la *stabilizzazione mediante un antiossidante* (fenoli, amine...).

Tra le categorie di *composti particolarmente instabili o esplosivi*, vi sono:

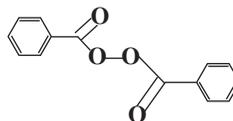
- I derivati del *perossido di idrogeno* come gli *idroperossidi* (terbutil idroperossido...), *perossidi* (benzoin perossido...), *peracidi* (acido peracetico...), *persali* (persolfato di ammonio...).



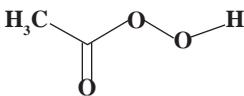
Perossido di idrogeno



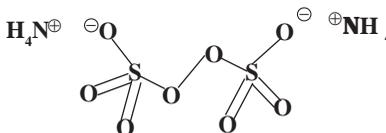
Terbutil-idroperossido



Benzoil perossido



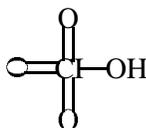
Acido peracetico



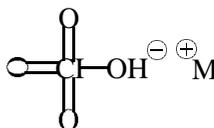
Persolfato di ammonio

Bisogna fare attenzione alla formazione di *composti perossidici* dalla *auto-ossidazione all'aria* di alcuni *monomeri* (acrilati, metacrilati, stirene...) o di alcuni solventi come eteri (etere dietilico, 1,4-diossane...) perchè questi derivati perossidici sono altamente instabili al calore.

La *presenza degli idroperossidi* può essere evidenziata con una *soluzione acquosa di ioduro di potassio* leggermente acidificata (CH₃COOH) o con l'utilizzo di una *striscia di carta impregnata con amido iodurato*.



Acido perclorico



Perclorato (di un metallo monovalente)

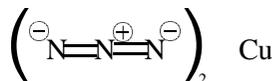
- I derivati dall'acido perclorico (HClO_4) come i perclorati (ClO_4^-) sono per la maggior parte instabili e possono esplodere per rapido riscaldamento o per mezzo di una raschiatura con una spatola metallica.
- I derivati dall'acido azotidrico (HN_3) come molte azidi (N_3^-) possono essere molto instabili. Così le soluzioni acquose di sodio azide (NaN_3) usate come battericida non devono essere conservate in un contenitore metallico (evitare specialmente il rame), perchè si possono formare azidi esplosive come l'azide di rame ($(\text{N}_3)_2\text{Cu}$).



Acido azotidrico



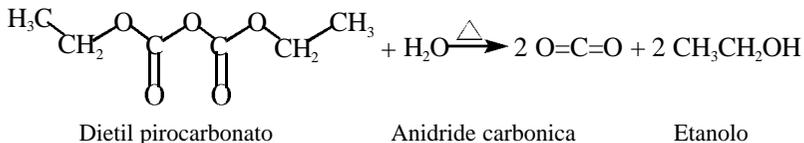
Azide (di un metallo monovalente)



Azide rameica

Qualche volta i biologi usano sostanze chimiche instabili. Essi non conoscono i rischi perchè le informazioni sono spesso difficoltose da trovare. È altamente necessario leggere l'etichetta e la scheda di sicurezza.

Se ad esempio, un po' di dietil pirocarbonato (DEPC) è conservato in un frigo senza areazione, un lento aumento di temperatura potrà indurre la decomposizione di DEPC per idrolisi con uno sviluppo violento di anidride carbonica (CO_2) e la successiva esplosione del contenitore: figura 4.



Dietil pirocarbonato

Anidride carbonica

Etanolo

Figura 4. Idrolisi del dietil pirocarbonato

Si raccomanda di effettuare una ricerca bibliografica prima di usare *sostanze chimiche instabili* o sostanze chimiche con una *stabilità sconosciuta*, o prima di preparare una *miscela instabile*. Tuttavia, non è sempre facile effettuare la *ricerca bibliografica* a causa della dispersione dei dati.

2. Rischi relativi alle sostanze chimiche infiammabili

L'*infiammabilità* di una sostanza chimica o di una miscela è una caratteristica importante. Il *rischio* corrispondente è l'*accensione* e la *propagazione degli incendi*.

Sono necessari tre elementi:

- *Combustibile* o carburante.
- Un *ossidante* che è generalmente l'*ossigeno* (21% nell'aria).
- Una *fonte di innesco* per iniziare la *reazione di combustione*. Essa può essere una *scintilla*, una *fiamma*, un *eccessivo calore*, ecc.

Parecchi *parametri fisico-chimici* devono essere presi in considerazione per valutare i *rischi di infiammabilità*. Tre di loro sono essenziali:

- i *limiti di infiammabilità*
- il *punto di infiammabilità*
- la *temperatura di auto accensione*

Inoltre, per valutare il *rischio di infiammabilità* e il *rischio tossicologico* di una sostanza chimica, devono essere considerate la *volatilità* e la *pressione di vapore massima*, parametri che danno informazioni sulla *quantità di vapore emesso* e sulla *percentuale di evaporazione*.

Le sostanze chimiche infiammabili possono essere *gassose*, *vapori di liquidi volatili* o di *solidi, sostanze chimiche solide* come *metalli finemente polverizzati* (zinco, magnesio, nickel...).

a) Pressione di vapore

La *pressione di vapore* di un liquido è un importante parametro di

sicurezza, essa corrisponde alla *pressione* esercitata su un *liquido* dal suo *vapore*. A questa *pressione*, c'è un *equilibrio dinamico* tra la fase *liquida* e la *gassosa*.

Dalla *pressione di vapore nell'aria all'equilibrio*, l'operatore può dedurre se c'è un rischio di accensione o intossicazione.

Per il rischio di accensione, le concentrazioni (in volume) sono indicate in percentuale e per il rischio tossico, le concentrazioni sono in parti per milione (ppm).

$$1 \% = 10\ 000 \text{ ppm}$$

b) Percentuale di evaporazione

La *percentuale di evaporazione* può essere quantificata confrontando la velocità di evaporazione dei composti liquidi con quella dell'etere dietilico (comunemente chiamato etere) considerato come il solvente più volatile ($v = 1$).

$$\text{Volatilità} = \frac{\text{Velocità evaporazione della sostanza chimica}}{\text{Velocità di evaporazione dell'etere}}$$

c) Limiti di infiammabilità

Per avere accensione e propagazione dell'incendio di un *gas* o *vapore* (da un *liquido volatile*), la *sostanza chimica volatile* (combustibile) deve essere miscelata con *aria* (ossidante) in una speciale percentuale.

La concentrazione deve essere tra due limiti:

- il *limite superiore di infiammabilità* (Upper Flammability Limit, UFL)
- il *limite inferiore di infiammabilità* (Lower Flammability Limit, LFL)

I valori dei limiti di infiammabilità (FL) e di esplosività (EL) sono calcolati in *percentuale di gas o vapori nell'aria*: figura 5.



Figura 5. Domini di infiammabilità e di esplosività

I limiti di esplosività (LEL e UEL) di miscele gassose non sono molto differenti dai limiti di infiammabilità (LFL e UFL).

d) Punto di accensione

Il punto di accensione è un parametro sperimentale. Esso rappresenta la temperatura alla quale l'emissione di vapore è sufficiente a raggiungere una composizione corrispondente al limite inferiore di infiammabilità (LFL).

Ad una concentrazione corrispondente al LFL, una scintilla può provocare un'esplosione.

La temperatura misurata in una vaschetta aperta è da 5 a 10 °C più alta che la temperatura ottenuta con la vaschetta chiusa.

Il punto di accensione è il parametro essenziale per determinare il rischio di incendio.

Nella zona di rischio (figura 5), una scintilla prodotta in modo meccanico (attrito) o di origine elettrica o l'elettricità statica risultano essere particolarmente rischiose.

Più è basso il punto di accensione, più il liquido è infiammabile e quindi pericoloso.

PUNTO DI ACCENSIONE	CARATTERISTICHE DI INFIAMMABILITÀ
Meno di 0 °C	Altamente infiammabile
Tra 0 °C e 25 °C	Facilmente infiammabile
Tra 25 °C e 55 °C	Infiammabile

Ad esempio il punto di accensione dell'*isopentano* (solvente usato in biologia come solvente liquido per crioscopia) è - 49 °C. Ciò lo rende una *sostanza chimica altamente infiammabile*, più rischiosa dell'*etere etilico* il quale punto di accensione è - 44°C.

e) **Temperatura di auto-accensione**

Per una *percentuale di gas/aria nel limite di infiammabilità*, l'accensione può essere provocata da una *fiamma* o una *scintilla* ma anche da un *aumento di temperatura*.

La temperatura di auto-accensione corrisponde quindi alla temperatura alla quale una sostanza chimica diventa infiammabile senza alcuna sorgente di accensione.

Per esempio, il *disolfuro di carbonio* (CS₂), un tempo usato per l'estrazione dei lipidi, diventa spontaneamente infiammabile quando scaldato a una temperatura superiore a 90 °C mentre l'etere etilico diventa spontaneamente infiammabile sopra 160 °C.



Disolfuro di carbonio

f) **Alcuni suggerimenti per maneggiare e conservare le sostanze chimiche**

In un laboratorio dove si usano *sostanze chimiche infiammabili*, i *rischi di incendio* devono essere presi continuamente in considerazione. Inoltre, alcuni semplici principi devono essere applicati:

- *Mai usare sostanze chimiche infiammabili vicino a una fiamma o ad una fonte di calore.* Le sostanze chimiche molto infiammabili devono essere usate in piccole quantità e quando è possibile, sotto una cappa chimica ben ventilata.
- *Non conservare contenitori di solventi infiammabili* (flaconi, ecc.) *su scaffali o ripiani o sopra il piano di lavoro.* Essi devono essere collocati in un armadio ventilato o in un mobiletto che sarà appositamente localizzato in modo da non ostruire le uscite di sicurezza.
- *Non conservare altresì rilevanti quantità di sostanze chimiche infiammabili nel laboratorio.* La quantità di sostanze chimiche

infiammabili non dovrà superare il consumo di 1 o 2 giorni per ridurre i rischi in caso di incendio.

- *Non conservare liquidi volatili infiammabili in contenitori non chiusi in frigo.* Tutti i frigoriferi del laboratorio devono avere un termostato esterno e nessuna luce interna (frigo sicuro).

In caso di incendio, si devono usare gli appositi estintori. È necessario conoscere dove sono localizzati gli estintori e quale genere di estintore debba essere utilizzato (estintore specifico secondo la sostanza chimica).

È importante organizzare esercitazioni anti-incendio per padroneggiare particolarmente l'uso degli estintori.

B. PROPRIETÀ DELLE SOSTANZE CHIMICHE E RISCHI ASSOCIATI

Molte *reazioni chimiche*, definite *reazioni pericolose*, sono responsabili d'incidenti, dovuti alla *reattività delle sostanze* coinvolte (polimerizzazione violenta di *monomeri*, sostanze chimiche *incompatibili* miscelate assieme).

Alcune sostanze chimiche reagiranno violentemente con *acqua* o *ossigeno* che sono onnipresenti nell'ambiente. Altre sostanze chimiche interagiranno in una maniera incontrollabile e spesso violenta.

La figura 6 riassume le possibili *incompatibilità* tra due o più sostanze chimiche.

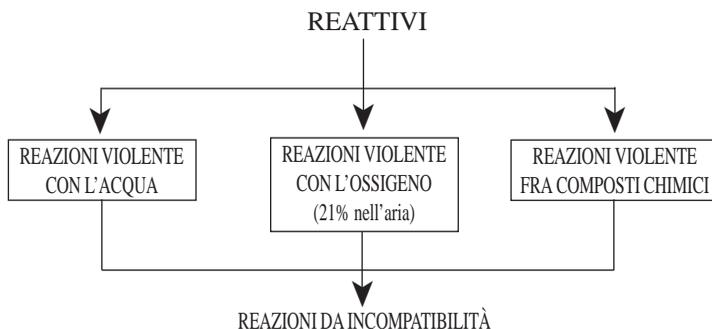


Figura 6. Principali tipi di reazioni da incompatibilità

In laboratorio si dovrà evitare di mettere in contatto fra loro sostanze chimiche incompatibili. Se questo deve essere fatto sarà opportuno usare piccole quantità per aumentare la sicurezza.

L'immagazzinamento delle sostanze chimiche deve essere sicuro e ben organizzato prendendo in considerazione la compatibilità chimica dei vari prodotti.

1. Reazioni con l'acqua

Alcune sostanze chimiche reattive possono violentemente reagire con l'acqua (reazioni di idrolisi). L'idrolisi sviluppa più o meno calore e qualche volta viene prodotto gas infiammabile come l'idrogeno che in alcuni casi può incendiarsi. L'idrolisi di alcune sostanze chimiche reattive può rilasciare sostanze chimiche corrosive dette idracidi (l'acido cloridrico ne è un esempio).

Il dimetildiclorosilano, è usato come trattamento anti-adesivo per la vetreria di laboratorio (tubi di emolisi...) o come agente impermeabilizzante. In presenza d'acqua il dimetildiclorosilano si idrolizza liberando acido cloridrico (molto corrosivo) e alcuni derivati ossigenati organici di silicio (dimetilsilanoli) e polimeri (metil o dimetilsilossano) (figura 7).

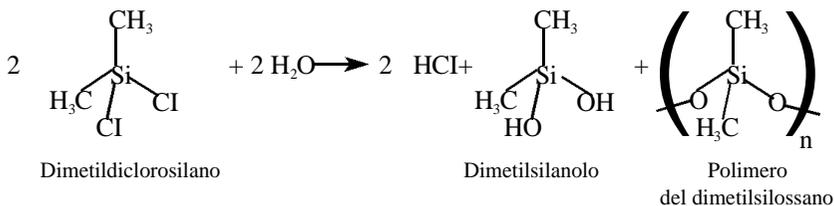


Figura 7. Idrolisi del dimetildiclorosilano

Alcuni composti instabili in presenza d'acqua possono rilasciare sostanze chimiche molto tossiche.

Alcuni agenti alchilanti usati in biologia molecolare venuti a contatto con l'acqua possono rilasciare prodotti molto reattivi. In caso di penetrazione nell'organismo, l'acqua dell'ambiente bio-

logico (circa il 75 % nell'organismo umano) idrolizzerà queste molecole, questo implica la formazione di alcuni agenti *intermedi reattivi*.

All'interno della cellula *questi reagenti* possono legarsi con *proteine e acidi nucleici* come il DNA. Nel caso del legame con il DNA, le *mutazioni*, talvolta irreversibili, possono iniziare un *processo di crescita tumorale*.

Nel caso del *dimetilsolfato* o DMS (reattivo usato per identificare sequenze interattive, come DNA-proteine nella tecnica Mobility Shift Assay), ci sono due reazioni competitive: da una parte una reazione di metilazione che può danneggiare il DNA; dall'altra un'idrolisi. (Figura 8).

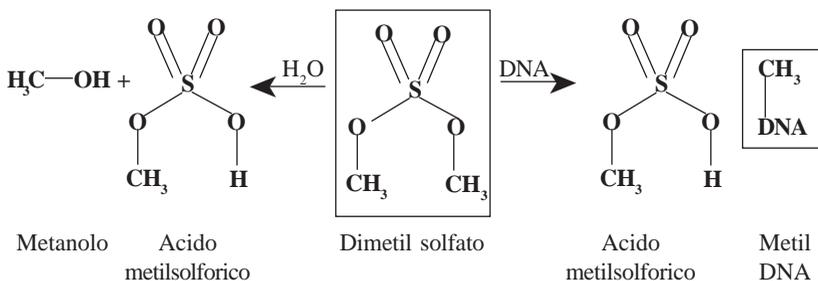


Figura 8. Reazione di dimetilsolfato con DNA o acqua

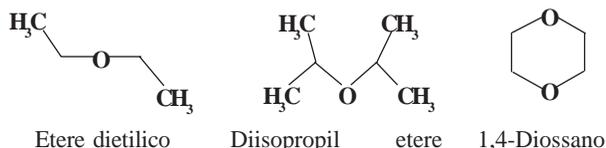
2. Reazione con l'ossigeno

Sono possibili due tipi di reazioni con *ossigeno* (O_2): *reazioni violente* (possono portare ad *esplosioni ed incendi*) o *reazioni lente* come sono le *reazioni di auto-ossidazione*.

Le *reazioni esplosive* sono piuttosto rare nei laboratori di biologia. Di solito, esse riguardano derivati dell'*acido perclorico* (HClO_4 , ClO_4^- ...), derivati dell'*acido azotidrico* (HN_3 , N_3^- ...) e derivati del perossido d'idrogeno (H_2O_2 , $\cdot\text{O}\cdot$, R-O-OH , R-O-O-R ...) come è spiegato nel capitolo A. 1.

Tuttavia, le *reazioni di auto-ossidazione* il cui meccanismo è di tipo radicalico (viene trasferito un solo elettrone alla volta) sono piuttosto frequenti e possono essere sorgente di esplosioni. Così i *solventi eterei* come l'*etere dietilico* (l'etere), l'*etere diisopropilico* (iso etere), *1,4-*

diossano (etere ciclico presente in alcuni liquidi scintillanti) possono essere rischiosi: se sono conservati all'aria e alla luce, possono perossidarsi e formare perossidi più o meno complessi (idroperossidi, perossidi, polimeri...). Questi prodotti molto instabili possono esplodere quando si cerca di purificarli mediante distillazione (il rischio di esplosione sorge specialmente alla fine della distillazione, quando questi derivati di perossidi instabili sono concentrati).



L'etere diisopropilico è un solvente facilmente perossidabile. Esso prima si auto-ossida in un diidroperossido abbastanza stabile, poi si trasforma lentamente nei perossidi ciclici dell'acetone (dimero e trimero) e in polimeri estremamente instabili. Questi polimeri sono responsabili delle esplosioni osservate durante la manipolazione di lotti vecchi di questo solvente (Figura 9).

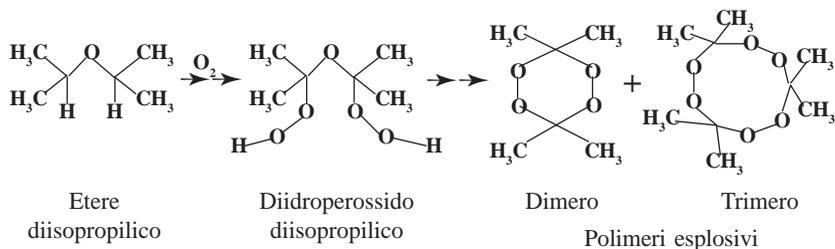
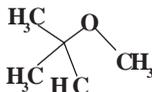


Figura 9. Auto-ossidazione dell'etere isopropilico in composti perossidici instabili

Gli *eteri perossidabili* possono essere sostituiti in modo vantaggioso dal *metilterbutil-etere* (MTBE) che è molto meno sensibile all'ossigeno.



Etere Metil Terbutilico (MTBE)

3. Reazioni rischiose, miscela di sostanze chimiche incompatibili

Le *sostanze chimiche* sono *incompatibili* quando provocano *reazioni incontrollabili e violente* se miscelate tra loro.

Come è stato detto prima, ci sono quattro tipi di reazioni che conducono a miscele estremamente rischiose:

- sostanze chimiche che reagiscono con l'acqua
- potenti ossidanti
- potenti riducenti
- monomeri facilmente polimerizzabili

a) Reazioni violente con l'acqua

Questo tipo di reazione esotermica è particolarmente comune nei laboratori e sovente la fonte di schizzi di sostanze chimiche corrosive sulla pelle o negli occhi.

L'*aggiunta veloce di acqua ad acidi forti concentrati* (H_2SO_4 ...) o a *basi forti* (NaOH , KOH , NH_4OH ...) è rischiosa e porta a schizzi violenti.

Al fine di evitare un tale problema si raccomanda di versare lentamente l'acido concentrato (o la base) in acqua fredda, ma mai l'opposto e facendo scendere lentamente l'acido o la base lungo la parete del contenitore.

Al fine di assicurare una miscela omogenea, quando si versa l'acido (o la base) nell'acqua è consigliabile l'agitazione della stessa.

La soluzione in acqua di *anidridi minerali* (anidride fosforica) o *organiche* (anidride acetica...) ma anche di alogenuri (acido cloridrico e acido bromidrico, *alogenuri* di fosforo e zolfo, bromuro di cianogeno), e di *esteri inorganici* (dimetil solfato, metansulfonati...) è sovente molto rischiosa (figura 10).

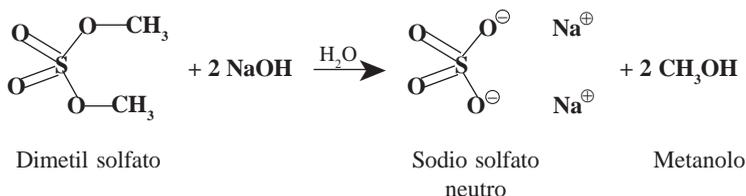


Figura 10. Scissione del dimetil solfato mediante idrolisi alcalina

In quel tipo di reazione, bisogna lavorare con piccole quantità dopo aver raffreddato l'acqua. Si deve lavorare sotto una cappa chimica ben-ventilata con tutti i dispositivi individuali di protezione e attrezzature adeguate (occhiali per la sicurezza con protezione laterale rispondenti all'EN166, guanti di protezione appropriati...).

b) Reazioni violente di ossidazione

Le *sostanze chimiche fortemente ossidanti*, specialmente se solide o finemente suddivise, risultano essere facilmente ridotte quando vengono in contatto con *agenti riducenti* (combustibili) come gli idrocarburi.

La stessa cosa si può dire per i *composti del cromo esavalente* (acido cromico, cromati, dicromati...) e per il *permanganato di potassio* (KMnO_4).

I composti del cromo esavalente sono dei potenti mutageni e cancerogeni per l'uomo. Anche il permanganato di potassio non è privo di rischi, pur essendo utilizzato come prodotto detergente; l'aggiunta di *acido solforico concentrato* ad una *soluzione concentrata di permanganato di potassio* (ancora peggio se si usano i cristalli) può innescare una violenta esplosione a causa della formazione di un intermedio, l'*acido permanganico* (HMnO_4), e della sua *anidride* (l'*anidride permanganica*, Mn_2O_7) che sono particolarmente instabili (figura 11).

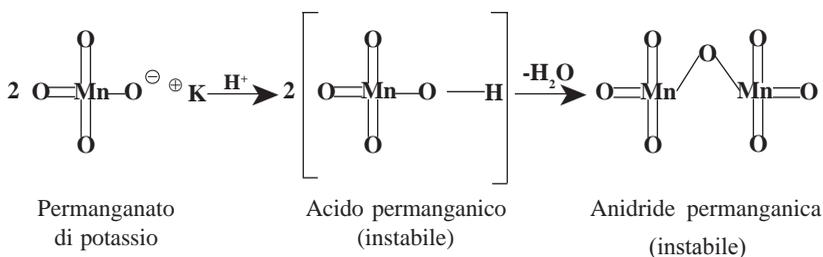


Figura 11. Formazione dell'anidride permanganica da permanganato di potassio in ambiente fortemente acido

c) Reazioni violente di riduzione

Gli *agenti fortemente riducenti*, meno comuni nei laboratori biologici di quelli fortemente ossidanti, possono dare origine ad un'esplosione in presenza di ossidanti.

Ma un forte ossidante come il permanganato di potassio può non decomporre direttamente l'*idrazina* (H_2N-NH_2) sotto forma idratata ($H_2N-NH_2 \cdot H_2O$), usato per sequenziare il DNA. Questo tipo di reazione esotermica è molto violenta e, inoltre, si possono sviluppare dei gas tossici come l'ossido di azoto.

d) Reazioni di polimerizzazione esplosive

Molti *monomeri* (specialmente quelli non stabilizzati) possono costituire delle miscele estremamente instabili.

In particolare, la presenza di impurezze (acidi, basi, altri iniziatori di reazioni radicaliche come gli idroperossidi, i perossidi, i sali di metalli di transizione...) che possono iniziare una *violenta polimerizzazione* dei monomeri come certi *composti etilenici* (etilene, stirene, acrilati, metacrilati, acrilamide...) o i loro derivati (epossidi...).

Così, l'*ossido di etilene*, utilizzato per la sterilizzazione, può polimerizzarsi in maniera esplosiva per semplice riscaldamento e presenza di tracce di basi minerali (figura 12).

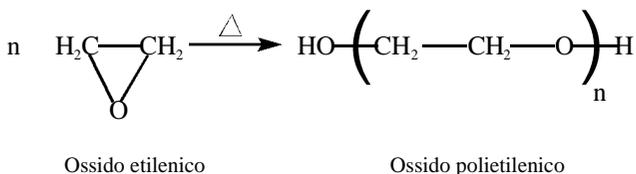


Figura 12. Polimerizzazione dell'ossido etilenico in ossido polietilenico

Infatti, l'ossido di etilene deve essere usato ad una concentrazione inferiore al 10 %, diluito con anidride carbonica.

Alcune delle *sostanze chimicamente incompatibili* che possono essere utilizzate in un laboratorio di biotecnologie sono elencate nella tabella 1. Questa lista non è completa, pertanto si consiglia di consultare manuali specializzati.

Tabella 1. Principali sostanze e gruppi incompatibili

SOSTANZE CHIMICHE O GRUPPI	SOSTANZE INCOMPATIBILI	REAZIONI VIOLENTE ESOTERMICHE	COMBUSTIONE SPONTANEA	RILASCIO DI GAS TOSSICI
Acidi minerali forti (HCl, H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , Ö)	Acqua Basi forti	++		
	Cianuri Azidi Solfuri Ipocloriti			++++
HClO₄	Materiali organici combustibili (legno, cotone, carta...) Alcoli (metanolo, etanolo, glicoli, glicerolo)	++	++	
Basi minerali forti (NaOH, KOH, NH ₄ OHÖ)	Acqua Acidi forti	++		
Potenti ossidanti (KMnO ₄ , CrO ₃ , O ₃)	Idrocarburi etenici ... Potenti riducenti	++	(++)	
H₂O₂ (concentrato)	materiale organico combustibile (grassi) Alcoli Acetone	++	(+)	
NaClO	Acidi Ammine Formaldeide	+		++

C. RISCHIO ASSOCIATO ALLE PROPRIETÀ TOSSICHE

Per un *organismo vivente*, le sostanze chimiche possono essere *elementi costitutivi e composti endogeni*. A questa categoria appartengono molecole di piccola e media taglia che sono molecole inorganiche come l'acqua, l'urea, il cloruro di sodio... o sostanze organiche come il glucosio, gli acidi grassi, le vitamine...

Gli organismi viventi possiedono anche molecole di grandi dimensioni chiamate *macromolecole*, quali le *proteine*, i *fosfolipidi insaturi* e gli *acidi nucleici* come il *DNA*.

Altre sostanze chimiche sono totalmente estranee agli organismi viventi e non partecipano alla loro attività biologica: questi sono i *composti esogeni*, detti *xenobiotici*, ovvero estranei alla vita.

Le sostanze base della chimica, (materie prime, monomeri, solventi...) ma anche sostanze più sofisticate utilizzate nella chimica fine come reattivi di laboratorio, medicinali, pesticidi, ecc., sono xenobiotici.

Di conseguenza prenderemo in considerazione solo gli *agenti tossici xenobiotici*, in particolar modo i *solventi* e le *sostanze chimiche* utilizzate in biologia.

1. Come definire un prodotto tossico?

Una sostanza chimica è definita *tossica* quando è *dannosa* per una o più funzioni fisiologiche degli *esseri viventi*.

La *tossicologia* è la scienza che studia le sostanze tossiche ed è multidisciplinare in quanto deve integrare nozioni di *chimica* e di *biologia*.

Grazie alla *tossicologia chimica*, si possono studiare le interazioni fra le sostanze, ad esempio uno *xenobiotico tossico* con il suo *bersaglio biologico*.

Quando avvengono queste interazioni, è possibile individuare il motivo per cui si produce un effetto dannoso sulla salute.

È evidente che il comportamento di uno xenobiotico debba essere considerato nel suo ambiente e l'impatto che può avere su differenti ecosistemi deve essere considerato come parte di un quadro globale dei possibili effetti tossici.

Questo quadro globale delle informazioni derivanti non soltanto dalla chimica ma anche dalla biologia, porta a definire la *tossicologia chimica* come un nuovo *approccio molecolare* alla tossicologia riassunto nella figura 13.

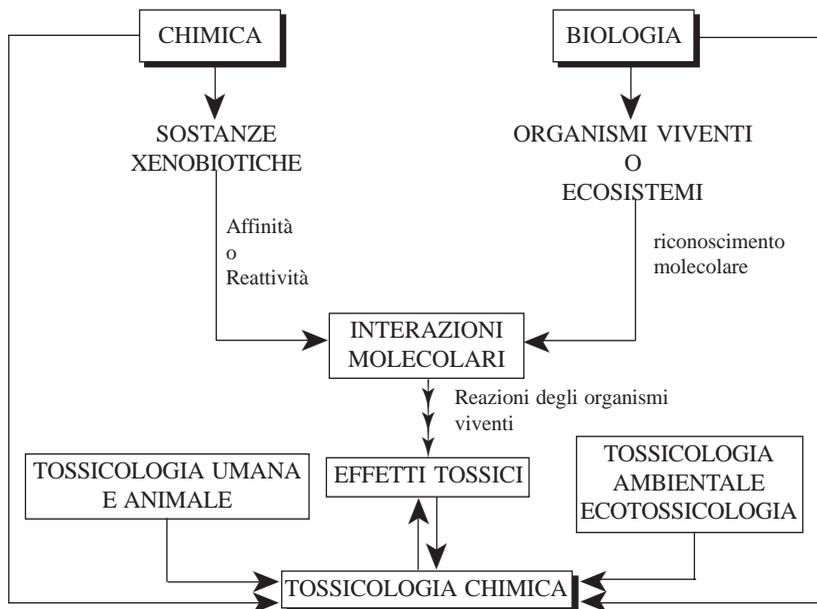


Figura 13. Comparsa di effetti tossici dall'interazione molecolare fra una sostanza xenobiotica e il suo bersaglio biologico

Tralasciando gli effetti locali (effetti corrosivi o irritanti) al sito di contatto delle sostanze chimiche aggressive, la prima condizione indispensabile affinché uno xenobiotico possa agire su un organismo vivente è la possibilità di penetrarvi.

2. Come può uno xenobiotico penetrare nell'organismo e diffondersi?

La *volatilità* e la *solubilità* sono due proprietà chimico-fisiche determinanti per la valutazione dei *rischi di tossicità* di una sostanza.

a) Ruolo della solubilità

Per quanto riguarda la *solubilità*, le sostanze chimiche sono distinte in *insolubili* (in acqua e nei grassi), *solubili* in acqua (sostanze chimi-

che idrosolubili) e *solubili nei grassi* (sostanze liposolubili) (figura 14).

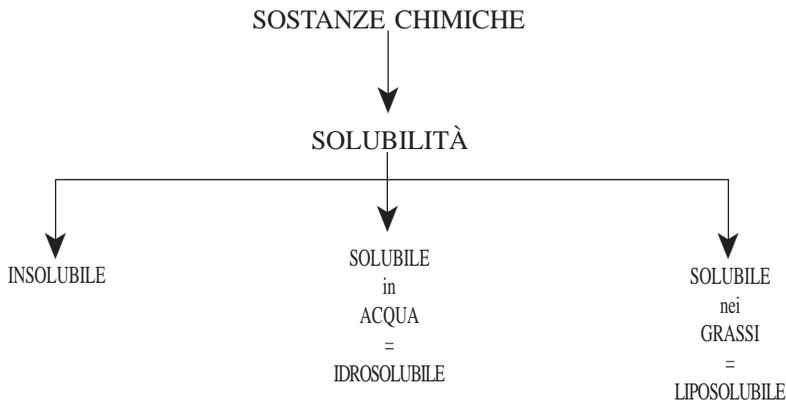


Figura 14. Principali tipologie di solubilità delle sostanze chimiche

La maggior parte degli xenobiotici si ripartiscono tra l'acqua (il maggior costituente dei fluidi biologici) ed i lipidi (importanti molecole delle membrane biologiche), questo fenomeno può essere quantificato per mezzo del *coefficiente di partizione*

$$\text{Coefficiente di partizione} = \frac{\% \text{ solubile in acqua}}{\% \text{ solubile nei grassi}}$$

Il coefficiente di partizione può dare informazioni sul destino di uno xenobiotico in un organismo vivente dal suo ingresso alla sua uscita.

b) Principali vie di penetrazione negli organismi viventi degli xenobiotici

Di solito uno xenobiotico può entrare nell'*organismo umano* attraverso *tre vie* principali:

orale, polmonare e cutanea. Più raramente esso può penetrare attraverso la via nasale e quella oculare.

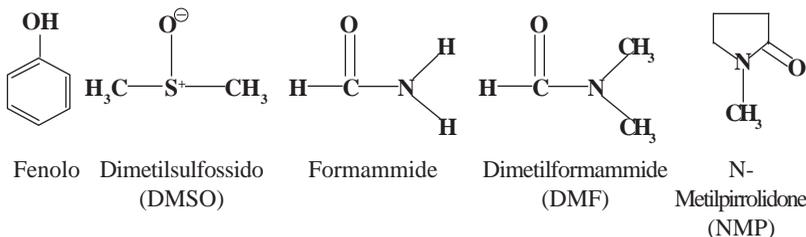
La via principale di penetrazione di uno xenobiotico in laboratorio è attraverso il tratto respiratorio. In effetti un grande numero di sostan-

ze chimiche possono entrare nell'organismo sotto forma di:

- *gas* o *vapore* (rilasciati in particolare da *liquidi volatili* come i solventi organici)
- *solidi finemente suddivisi* (polveri)
- *aerosol* (aria + solidi o liquidi finemente suddivisi)

Non bisogna trascurare tuttavia la penetrazione *attraverso la pelle* (e le mucose) siccome alcune sostanze entrano più facilmente attraverso questa via che non per inalazione. A questa categoria di sostanze chimiche appartengono alcuni solventi quali:

- fenolo
- dimetilsolfossido (DMSO)
- formammide e dimetilformammide (DMF)
- N- metilpirrolidone (NMP)

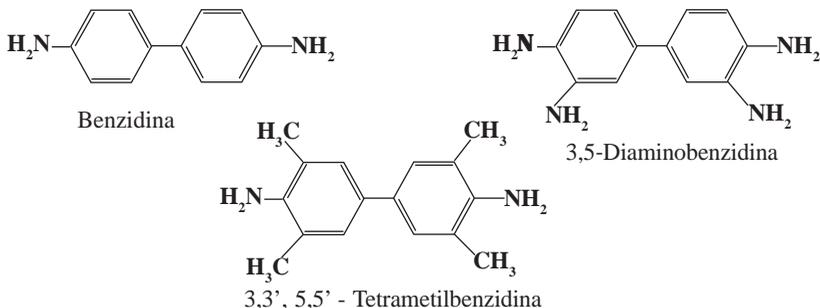


Alcuni reagenti utilizzati nei laboratori biologici sono particolarmente pericolosi in quanto essi sono facilmente assorbiti attraverso la pelle e sono molto tossici. È il caso delle *ammine aromatiche* e delle *benzidine*.

Nel passato la benzidina era spesso utilizzata per rilevare l'*attività perossidasi* (perossido di idrogeno/perossidasi) e oggi viene impiegata per l'*immunorilevazione* nel test ELISA. Essa è una *potente molecola cancerogena* che causa *tumori alla vescica* nell'uomo; molti casi di questo tipo di tumore sono stati riscontrati in persone che hanno lavorato in laboratorio con questi reattivi chimici.

In alcuni casi la *benzidina* viene sostituita con la 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina (TMB), una molecola che non è né mutagena né cancerogena. In altre applicazioni la *3,5-diaminobenzidina* (DAB) (che è risultata essere cancerogena nei test con animali) è un sostituto accettabile della benzidina, ma deve essere usata con attenzione.



Per la manipolazione delle sostanze chimiche facilmente assorbite per via cutanea sono richieste adeguate procedure e protezioni: guanti monouso, occhiali protettivi, cura nel lavarsi le mani, distruzione dei residui dopo l'uso.

c) Destino degli xenobiotici all'interno dell'organismo

Una volta entrati nell'organismo gli xenobiotici si diffondono in esso attraverso la *circolazione sanguigna*.

A seconda se la sostanza è solubile in acqua o nei grassi, il suo destino sarà differente.

In generale, le *sostanze chimiche idrosolubili* vengono *rapidamente eliminate* dall'organismo per via *renale* attraverso l'urina, dopo aver subito o meno biotrasformazioni.

I *prodotti xenobiotici molto solubili nei grassi* vengono generalmente accumulati nel compartimento lipidico (sistema nervoso, fegato, reni, midollo osseo, grasso...) da dove possono essere rilasciati dopo un periodo di tempo variabile, probabilmente dipendente dalla sostanza stessa.

Di solito, le *sostanze chimiche xenobiotiche lipofile* devono essere *metabolizzate* per essere eliminate dall'organismo. I *solventi organici lipofili* vengono metabolizzati nel *fegato*: essi vengono trasformati in

metaboliti solubili in acqua ed escreti attraverso le *urine* tramite i *reni*.

Alcuni xenobiotici con alto peso molecolare (circa 300) vengono eliminati dal *fegato* tramite la *bile*, ma attraverso il *ciclo entero-epatico* una parte di essi può essere riassorbita. Questo ciclo può aumentarne la tossicità, come nel caso dei *prodotti aromatici azotati*: essi vengono metabolizzati in *ammine aromatiche* nel fegato, eliminate attraverso la bile e riassorbite dall'*intestino*. Esse manifestano la loro *epatotossicità* durante la metabolizzazione nel *fegato*.

La figura 15 riassume le differenti possibilità di eliminazione dall'organismo degli xenobiotici idrosolubili e di quelli liposolubili.

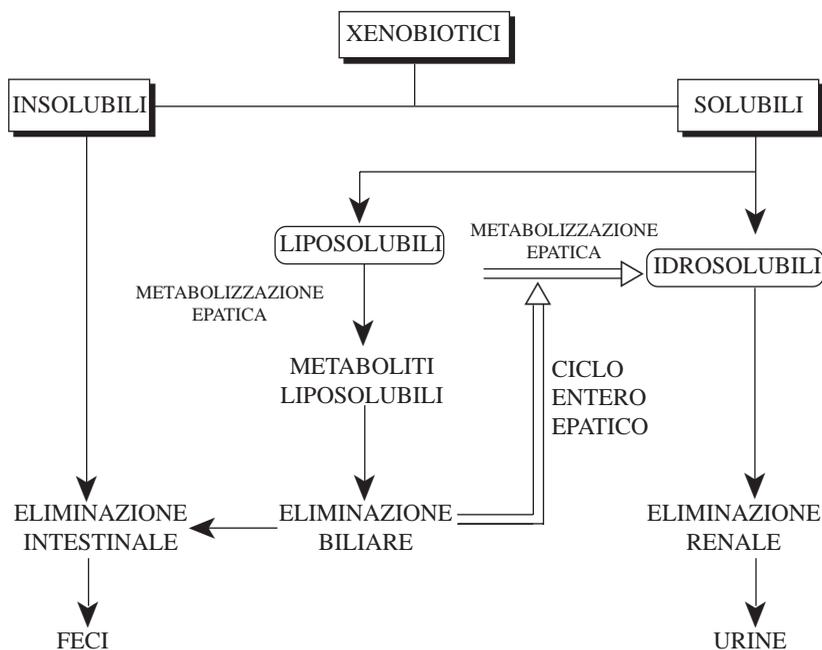


Figura 15. Eliminazione dall'organismo dei composti xenobiotici

Uno schema di questo tipo si adatta bene ad una *sostanza organica* come un *solvente lipofilo*, ma anche ad una *sostanza inorganica* come il *mercurio molecolare* che è abbastanza comune nei laboratori. Il mercurio si trova negli strumenti di misura (termometri, manometri...). Sotto forma di vapore può facilmente essere assorbito per inalazione:

siccome esso è leggermente *lipofilo* può passare attraverso le membrane degli *alveoli polmonari*.

Il mercurio è in grado di attraversare la *barriera emato-encefalica* localizzandosi nella *sostanza grigia del cervello*, inoltre può essere ossidato in *sale di mercurio* solubile in acqua che verrà poi eliminato *per via renale*.

Gli ioni mercurio possono indurre *processi infiammatori nel sistema nervoso* (encefaliti, polinefriti) e nei *glomeruli renali* (glomerulonefriti).

Nell'*intestino* gli *ioni mercurio* possono essere metilati ad ioni *metilmercurio* ($\text{CH}_3\text{-Hg}^+$), ciò facilita l'assorbimento intestinale, ma ne aumenta anche il passaggio nel *sistema nervoso*, come indicato nel figura 16.

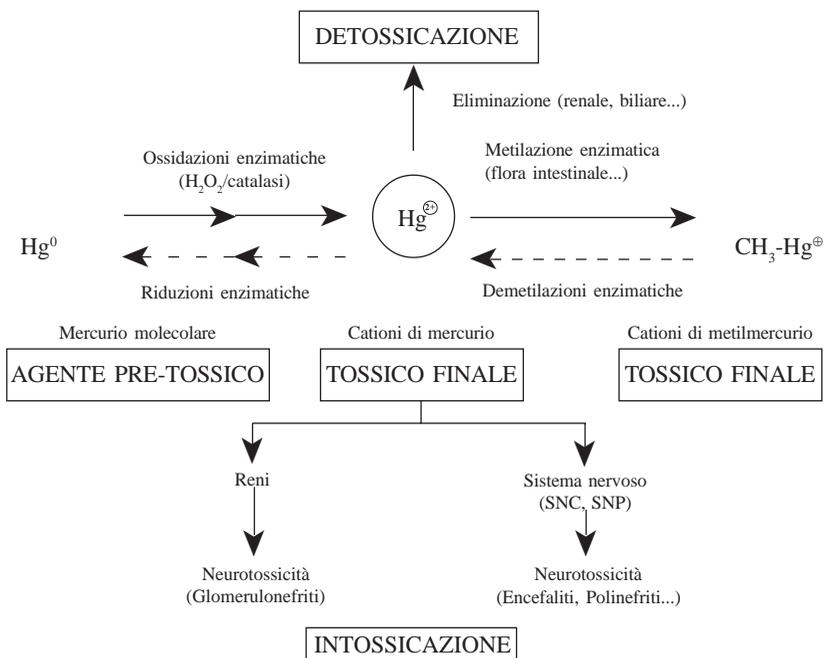


Figura 16. Differenti specie chimiche del mercurio, in relazione al bersaglio e agli effetti tossici

Nei laboratori biologici il *mercurio* si può trovare sotto *forma molecolare* (termometri...), *ionica* (sali di mercurio) e a volte sotto forma di *composti organometallici* come il *dimetilmercurio* ($\text{CH}_3\text{-Hg-CH}_3$). Il dimetilmercurio è una molecola volatile che può portare a morte

per semplice penetrazione cutanea. Siccome il pericolo è molto elevato, l'uso del mercurio e dei suoi composti deve essere limitato.

3. Quali sono le principali forme di tossicità

Uno *xenobiotico* può determinare *effetti tossici* con *due tipi di interazione*:

- *azione diretta della sostanza sul suo bersaglio* (dipende molto dalla reattività della sostanza)
- *per azione indiretta di un intermedio definito prodotto tossico finale*

Il prodotto tossico finale è un derivato dello *xenobiotico originale* (o agente *pre-tossico*), derivante da un *processo idrolitico* nell'*ambiente biologico* o da processi di *biotrasformazione* (*metabolizzazione enzimatica*).

Tramite la *sperimentazione* è possibile distinguere gli *effetti immediati*, cioè gli *effetti acuti* (a volte letali) da quelli *ritardati* nel tempo che portano a effetti tossici più o meno *a lungo termine*.

La figura 17 riassume questi differenti possibilità di azione.

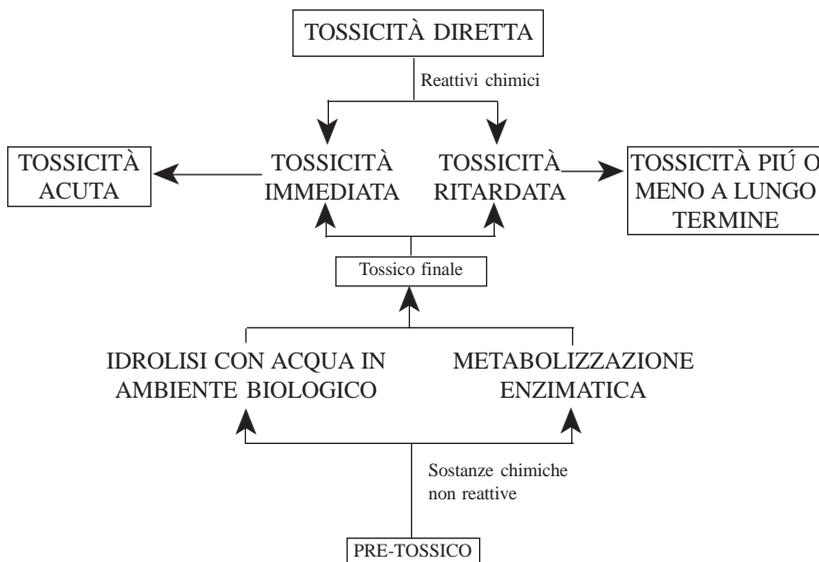


Figura 17. Principali forme di tossicità e effetti tossici degli xenobiotici

a) Tossicità acuta

La *tossicità acuta* si ha dopo la somministrazione di un'unica dose (o più dosi in 24 ore) che determina la morte del 50% degli animali dell'esperimento.

Il valore della *dose letale 50* (LD_{50}) o della *concentrazione letale 50* (LC_{50}) è un *parametro* molto usato per i *foglietti illustrativi*. La LC_{50} è il risultato di un'*inalazione continuativa* a varie concentrazioni.

I *simboli* associati (*molto tossico*, *tossico*, *nocivo*) devono essere presenti sull'*etichetta*.

Si deve tenere presente che la tossicità acuta è strettamente dipendente dalla specie animale, dal sesso, dalla via di introduzione... e che, di conseguenza, la semplice estrapolazione all'essere umano è molto rischiosa.

Tecniche alternative possono portare alla determinazione della *tossicità acuta* sulle *cellule animali* (test di citotossicità) evitando un uso eccessivo di animali.

Le *intossicazioni acute* sono rare nei laboratori e di solito dovute a *miscele di sostanze chimiche incompatibili* che rilasciano *gas molto tossici*.

Ad esempio, trattare una soluzione acquosa di *cianuro di potassio* (KCN) con un *acido*, anche se debole, libera *acido cianidrico*, un gas inodore ed estremamente tossico (figura 18).



Figura 18. Formazione di acido cianidrico per azione dell'acido cloridrico sul cianuro di potassio

La *sodioazide* (NaN_3) reagisce con gli acidi formando l'*acido azotidrico* (HN_3) che è un gas pericoloso quanto l'acido cianidrico.

Aggiungendo degli *acidi*, anche deboli come l'*acido citrico* (dal limone) ad una soluzione di *ipoclorito di sodio*, si libera *cloro molecolare* (Cl_2). Questo fenomeno può avere luogo quando si mescolano detersivi acidi alla candeggina (ipoclorito di sodio). Il cloro è un *gas molto corrosivo* che può rapidamente divenire mortale in uno spazio confinato (toilettes,...) (figura 19).



Figura 19. Formazione di cloro a partire da ipoclorito di sodio in ambiente acido

Nei *laboratori di biologia*, la manipolazione di alcune sostanze a tossicità acuta come le *tossine* (tossina botulinica, micotossina...) *alcaloidi* (stricnina, brucina...), *molecole farmacologicamente attive* (digitotossina...) deve avvenire con estrema attenzione.

Le tossine classificate come veleni ed etichettate con l'*icona del teschio* devono essere conservate in un *armadio chiuso a chiave*.

b) Tossicità a medio termine

Nelle sperimentazioni su animali la *tossicità a medio termine*, chiamata *tossicità subacuta* (in un periodo inferiore ai tre mesi) può dare informazioni sugli *organi bersaglio* che sono di preferenza coinvolti.

Il *tetracloruro di carbonio* (CCl_4), è un *solvente* utilizzato per estrarre i lipidi. Ora è vietato a causa della sua *azione distruttiva* sullo *strato di ozono* e per i suoi effetti sulla salute umana. Dopo inalazione raggiunge molto rapidamente il *fegato* dove causa *epatiti* seguite da *cirrosi*. Il *cloroformio* (CHCl_3) è spesso usato in biologia per l'estrazione del DNA (miscele di fenolo/ CHCl_3); a seconda delle specie animali ha due organi bersaglio che sono il *fegato* e i *reni*. Di regola occorre essere cauti con tutti i *solventi clorurati* (anche il cloruro di metilene anche chiamato *diclorometano*) poiché sono tutti *sostanze irritanti* e *neurotossiche*. Inoltre essi sono spesso anche *epatotossici*, *neurotossici* e dannosi per la riproduzione.

c) Tossicità a lungo termine

La *tossicità a lungo termine* è valutata dopo una *lunga esposizione a basse concentrazioni* di una sostanza chimica, per l'*intera durata della vita dell'animale da esperimento* (2 anni per i roditori come i topi e i ratti).

Gli effetti a lungo termine generalmente dipendono dalla dose totale assorbita e può essere fissata una *dose soglia*, ovvero la *dose massima* che non causa *danni irreversibili* alla salute.

I *limiti di esposizione occupazionale* sono determinati e pubblicati e devono essere rispettati durante il lavoro.

Si è notato che generalmente non c'è relazione fra la tossicità acuta e quella a lungo termine.

Molti degli effetti tossici sono dovuti all'*interazione* con gli *elementi costitutivi delle cellule* e specialmente con le *macromolecole essenziali: proteine* (enzimi, proteine di struttura, proteine di trasporto...) e *acidi nucleici* (RNA e specialmente DNA). I *fosfolipidi insaturi*, che sono i maggiori costituenti delle *membrane biologiche*, sono anche bersagli sensibili alle aggressioni (in special modo aggressioni ossidanti) degli xenobiotici tossici.

Gli effetti dannosi su un organo (fegato, reni, polmoni, midollo osseo, pelle...) o su un sistema (nervoso, digerente, riproduttore...) possono portare ad una *organotossicità* spesso abbastanza specifica.

Gli effetti immunotossici possono apparire dopo un'aggressione al *sistema immunitario* quali: *reazione di ipersensibilità* (allergie), *effetti immunodepressivi o immunosoppressivi* e *processi autoimmuni*.

La rilevazione precoce di queste reazioni immunotossiche è nella maggior parte dei casi difficile da effettuare mediante specifici test; nell'ambiente di lavoro le *allergie* sono spesso diagnosticate dal medico del lavoro.

Le *modificazioni del patrimonio genetico*, essenzialmente *DNA*, da parte di *xenobiotici genotossici* portano a *mutazioni* che, se non vengono riparate (o riparate male), possono portare ad una *proliferazione cellulare incontrollata* (tumore). Se vengono colpite le *cellule riproduttive* possono verificarsi delle *malformazioni nei discendenti*. È molto importante tenere in considerazione questo effetto teratogeno; sfortunatamente solo pochi composti chimici possono essere considerati veramente responsabili di questi effetti sull'uomo.

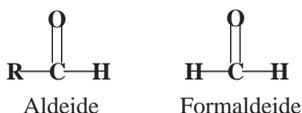
Il diagramma 17 sintetizza i principali *effetti tossici* che i veleni diretti o gli agenti *pre-tossici* possono avere dopo la *metabolizzazione enzimatica*.

Alcune *sostanze chimiche* usate nei *laboratori biologici e biotecnologici* possono presentare una varietà di *effetti sulla salute umana*: sia a *breve* che a *lungo termine*.

Vi sono molti esempi, di seguito verrà riportato quello della

formaldeide.

La formaldeide è un' *aldeide* (della famiglia dei composto *carbonilici*, con una *funzione aldeidica*) *molto reattiva*. È comunemente utilizzata in laboratorio come *fissativo istologico* (ibridazione in situ di geni) o come *disinfettante*.



Si può trovare come *soluzione acquosa* in concentrazione da 30 a 56% in peso di *formaldeide*, contenente una quantità variabile di *metanolo* (CH_3OH) che stabilizza la soluzione. Può anche essere in *forma solida* come la *para-formaldeide* ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$), un polimero lineare usato per la preparazione di formaldeide libera da metanolo. Sotto forma di *gas* la *formaldeide* è un agente *irritante* per gli *occhi* e le *vie respiratorie* che può essere molto *corrosivo* alle alte concentrazioni.

A seconda delle persone (della sensibilità individuale) l'effetto irritante ha luogo già alla concentrazione di poche ppm (da 1 a 5 ppm) e diventa assai aggressivo sopra le 10-20 ppm.

Le *soluzioni acquose concentrate* sono *caustiche* per la pelle, la loro *ingestione* può essere molto grave causando *attacchi gastrointestinali*, epatici, renali e polmonari e può portare al *coma* e successivamente al decesso.

Oltre alle *classiche irritazioni* delle *mucose nasali e oculari*, sono stati osservati anche danni più gravi, *a lungo termine*, come *patologie croniche del sistema respiratorio* (bronchiti...). La formaldeide è riconosciuta altresì come un *potente allergene* che può portare a *ipersensibilità cutanee* (eczema, orticaria, ...) e *respiratorie* (riniti, asma,...), seguite talvolta da un *potente shock anafilattico*.

Gli *effetti sulla riproduzione*, in particolare le complicazioni durante la gravidanza, sono già stati menzionati.

Sperimentalmente, questo è un composto genotossico e mutageno per diversi sistemi biologici, cancerogeno sui ratti. Nell'*epidemiologia umana*, i risultati delle ricerche sono molto vari con *localizzazione* dei

tumori assai diversa (organi ematopoietici, cervello, colon, laringe, prostata...); pertanto la classificazione attuale di questa sostanza è *probabile cancerogeno per l'uomo* (gruppo 2A, IARC, **Lione, 1995**).

Un *utilizzo pericoloso* è stato descritto in ospedale: l'aggiunta di *acido cloridrico* ad una *soluzione acquosa di formaldeide* allo scopo di incrementare il suo potere *disinfettante*; essa porta alla formazione di *bis-clorometiltere* una *sostanza volatile cancerogena per l'uomo* (classificata nel gruppo 1 dallo IARC)

L'esempio della formaldeide riassume la molteplicità dei bersagli biologici per un unico xenobiotico tossico. Per ciò, la protezione da applicare per una tale sostanza volatile, deve includere non solo norme generali (ventilazione...) ma anche *protezioni individuali* (maschere, guanti protettivi e occhiali).

Prevenzione del rischio chimico

Uno degli obiettivi essenziali della *prevenzione del rischio chimico* è evitare ogni interazione delle *sostanze chimiche* con altre (acqua, ossigeno, sostanze incompatibili...) o con elementi vitali costituenti l'organismo. Di regola i prodotti chimici devono essere considerati *sostanze potenzialmente pericolose*.

Al fine di *controllare il rischio* bisogna stabilire *misure preventive collettive e rispettare misure individuali di sicurezza* di ordine generale.

Prima di tutto devono essere prese misure di prevenzione collettiva, esse devono avere la priorità sulle misure di protezione individuale.

Un primo intervento di prevenzione è quello di *identificare il pericolo* e l'eventuale *rischio*, leggendo *dati sulla sicurezza* nella *manipolazione di sostanze chimiche* (pure o sotto forma di preparazioni).

Regole generali sulla prevenzione del rischio chimico sono scritte nelle *direttive 80/1107/CEE* e *88/642/CEE*.

I *principi fondamentali* della *prevenzione* sono applicati al rischio chimico ed essi sono descritti nel Capitolo sulla manipolazione di agenti genotossici.

A. MISURE COLLETTIVE

In *biotecnologia* devono essere applicate le *regole generali riguardanti l'organizzazione del laboratorio*.

1. *Regole generali di funzionamento.*

L'*elaborazione di regole generali di funzionamento* deve essere compiuta rigorosamente e con precisione. Devono essere coinvolte differenti figure professionali: i *responsabili scientifici*, i *servizi di sicurezza e medicina del lavoro*, i *comitati di igiene e sicurezza*, e gli *addetti del laboratorio*.

Ogni rilevante trasformazione del laboratorio deve essere studiata tenendo conto di un aumento della sicurezza

I *dirigente del laboratorio* (direttore, capo servizio...) sono responsabili della sicurezza dei loro impiegati. Essi devono *far rispettare le istruzioni sulla sicurezza*. Il *materiale per la protezione* necessario deve *essere accessibile* ai lavoratori. Ogni lavoratore si assume la personale responsabilità per la propria sicurezza e per quella delle altre persone presenti nel laboratorio.

2. *Istruzioni sulla sicurezza*

Le *istruzioni sulla sicurezza* (generali e specifiche, piano di evacuazione, numeri di telefono di emergenza...) *devono essere messe in laboratorio in un punto ben visibile ed accessibile*. Queste istruzioni devono essere chiare e brevi.

Sulla porta del laboratorio, deve essere visibile un'*icona* con il *simbolo corrispondente al pericolo specifico*. Per esempio, pericolo biologico se il laboratorio manipola organismi geneticamente modificati o agenti biologici come descritto nel capitolo dedicato.

Ogni irregolarità o incidente deve essere segnalata, anche se essa viene considerata di poco conto. Se possibile esso deve essere scritto in un registro speciale riservato agli incidenti. Questo documento deve

essere disponibile alla consultazione da parte di qualsiasi impiegato.

3. Sistema di aerazione

Un laboratorio in cui si manipolano sostanze chimiche deve essere fornito di un *sistema di aerazione* al fine di garantire la qualità dell'aria dell'ambiente.

I *sistemi di ventilazione* sono essenziali per garantire la sicurezza in laboratorio. Essi possono essere molto vari: cappe chimiche ventilate, cappe a flusso laminare, cappe di terza classe a tenuta ermetica ecc.

La *ventilazione* rimane la migliore forma di protezione contro le sostanze *inquinanti*, qualsiasi sia la loro natura.

In laboratori, l'*installazione* degli *apparecchi di ventilazione* non deve creare disagi ai lavoratori, in particolare per quanto riguarda il rumore e le vibrazioni.

A prescindere dal tipo di ventilazione, l'impianto deve ricevere manutenzione ed essere controllato per lo meno una volta all'anno.

Le cappe chimiche devono avere filtri compatibili con le sostanze inquinanti che devono essere filtrate. Anche il controllo di questo tipo di dispositivo deve essere fatto almeno una volta all'anno.

4. Posizionamento dei dispositivi di sicurezza

Il *posizionamento* dei *dispositivi di sicurezza* del laboratorio deve essere *conosciuto*:

- *estintori* (che devono essere operativi e controllati periodicamente)
- *maschere antigas* (con le cartucce adatte)
- *coperte ignifughe* (prive di amianto)
- *docce di sicurezza e sistemi per il lavaggio degli-occhi* (puliti ed operativi)

I *dispositivi per fermare i fluidi* (acqua, gas) e l'*erogazione di corrente* devono essere accessibili e facilmente localizzabili.

Le *fonti di pericolo associate ai fluidi* (dispositivi a gas, fornelli Bunsen) e all'*elettricità* (apparecchiature imperfette, spine non a norma) devono essere al più presto eliminate.

È importante partecipare alle sessioni di *prova antincendio* e *imparare come usare gli estintori* e le *maschere antigas*.

5. *Buone pratiche di laboratorio*

- Un *laboratorio* deve essere *pulito e ordinato*: installazioni, dispositivi e strumenti devono essere tenuti in condizioni ottime e puliti.
- Gli *spazi riservati alla manipolazione*, le *vie di circolazione* e le *uscite di emergenza* devono rimanere *liberi e puliti*.
- Le *porte tagliafuoco* devono rimanere chiuse.
- I *pavimenti* devono rimanere *puliti e sgombri* da ogni ostruzione.
- Gli spazi di lavoro devono essere mantenuti in perfette condizioni di pulizia.
- La *postazione di lavoro* deve essere mantenuta costantemente *libera* da *dispositivi* e *contenitori non necessari al momento*. Alla fine della manipolazione ogni cosa deve essere pulita e *ogni operatore deve personalmente prendersi cura* dei materiali che risultino *contaminati o pericolosi* e dei *rifiuti*.
- I *contenitori* devono essere riposti in *armadi di deposito* o su *scaffali riservati* a questo uso.
- Le *cappe* non devono essere usate per depositare contenitori chimici o piccoli strumenti di laboratorio.
- La *vetreria rotta* o *scheggiata* deve essere immediatamente *rimpiazzata*.
- Gli *aghi* e gli *oggetti taglienti* (bisturi, coltelli...) devono essere messi in *contenitori* riservati a questo uso.
- Gli *aghi* non devono mai essere rincappucciati.

6. *Deposito delle sostanze chimiche*

Il *deposito delle sostanze chimiche* in un laboratorio deve rispettare

misure rigorose, specie per quanto riguarda le *quantità*:

- di *liquidi infiammabili* (evitare contenitori di vetro di più di un litro di solventi molto infiammabili), prodotti chimici corrosivi (acidi e basi forti, potenti ossidanti e acidi alogenidrico)
- di *sostanze chimiche corrosive* (acidi e basi forti, potenti ossidanti)
- di *sostanze chimiche che reagiscono violentemente con l'acqua* (metalli alcalini, ibridi, composti organometallici)
- di *sostanze chimiche che reagiscono violentemente con l'ossigeno* (fosforo bianco, ...)

Le *sostanze chimiche incompatibili* devono essere *tenute separate* e, quando possibile, i prodotti chimici devono essere *raggruppati per grandi famiglie*:

- acidi minerali forti
- basi minerali forti
- potenti agenti ossidanti
- potenti agenti riducenti
- sostanze che reagiscono con l'acqua
- sostanze che reagiscono con l'ossigeno

Per la *conservazione delle sostanze chimiche* devono essere utilizzati:

- *vaschette* fatte di *plastica* resistente
- *scaffali* di *acciaio* ricoperte con una protezione contro le sostanze chimiche

Tutti i *contenitori* devono avere una *etichetta conforme alla legge* in buone condizioni.

Tutte le sostanze chimiche immagazzinate devono essere elencate. Lo stato dei lotti deve essere controllato regolarmente.

Bisogna evitare di conservare quantità troppo ingenti di *liquidi infiammabili* in laboratorio: la quantità conservata deve essere minore del corrispondente consumo di una o due giornate di lavoro.

I *solventi infiammabili* devono essere conservati in *armadi per solventi*, equipaggiati in modo specifico (materiali non combustibili, vaso di ritenzione, ventilazione permanente, impianto elettrico anti deflagrazione, meccanismo di estinzione automatico).

I grandi istituti di ricerca devono avere un sistema centrale di *deposito dei solventi* costruito e installato secondo gli standard di legge.

7. *Misure igieniche*

Le misure igieniche elementari devono essere rispettate:

- In laboratorio *indossare un camice* confezionato con fibre *non sintetiche*.
- *Lavarsi le mani* dopo ogni manipolazione.
- *Legarsi i capelli* se sono lunghi.
- *Non conservare cibi o bevande* nel *frigo* destinato alla conservazione delle sostanze chimiche.

È *vietato mangiare, bere* (specialmente nella vetreria di laboratorio) o *fumare* al lavoro . Se possibile deve essere *riservata una stanza* per le *pause* e una zona per i *fumatori*.

Una *pulitura giornaliera dei pavimenti* evita l'accumularsi di sporcizia carica di pericoli chimici.

B. MISURE INDIVIDUALI

Per *lavorare in laboratorio con la massima sicurezza*, devono essere *rispettate diverse misure per la protezione individuale*.

1. *Protezione degli occhi*

Spruzzi ed esplosioni sono spesso inaspettate. Fra gli incidenti di laboratorio quelli agli occhi sono i più frequenti e seri. In laboratorio

bisogna *indossare occhiali protettivi*. In caso di manipolazione ad alto rischio è necessario lavorare sotto una *cappa chimica ventilata* delimitata da un *pannello frontale scorrevole di policarbonato* per la protezione dell'operatore.

2. Protezione delle mani

I *prodotti chimici corrosivi* (acidi e basi forti, potenti agenti ossidanti) e i *composti che facilmente penetrano attraverso la pelle* (derivati dei nitrati, ammine aromatiche, ...) devono essere maneggiati con i guanti corrispondenti al tipo di sostanza chimica utilizzata (guanti di cotone, lattice, vinile, fluorocarbonato).

La *scelta dei guanti dipende dal tipo di sostanza usata*. Tuttavia non è sicuro che essi assicurino una protezione totale contro la penetrazione cutanea. *Lavorare con la vetreria* porta spesso ad incidenti (tagli ai tendini) Occorre essere sufficientemente protetti durante queste attività (guanti e stracci).

3. Protezione delle vie respiratorie

I lavori con gas tossici (fosgene, cloro, solfuro di idrogeno, monossido di carbonio) devono essere svolti se possibile con una maschera di protezione delle vie respiratorie, possibilmente usando un auto-respiratore. Non è necessario indossare maschere con cartucce quando la percentuale di vapori tossici nell'aria è sotto il 2%.

Si deve conoscere dove è posizionata la maschera di protezione e bisogna conoscerne il modo di impiego.

Per *migliorare le condizioni di lavoro e prevenire gli incidenti*, è importante fissare i *valori limite di esposizione* (l'americano TLV-TWA, il tedesco MAC e i francesi VME e VLE)

Riguardano tuttavia in particolare i prodotti chimici puri.

Queste condizioni sono spesso assai lontane dalla realtà lavorativa del laboratorio dove i prodotti chimici sono spesso associati ad altri fattori dannosi (fisici, radioattivi, microbiologici, psicologici. ...).

4. Protezione generale del corpo

Si deve indossare un *camice pulito di cotone* (non sintetico) e rispettare un'igiene personale rigorosa (lavarsi le mani...)

Come regola generale *mai lavorare da soli*, specialmente di *notte* o durante i giorni festivi.

IMPIEGO DEI COMPOSTI GENOTOSSICI, MUTAGENI E CANCEROGENI

Marcel Castegnaro

*Bisogna adottare precauzioni particolari quando si conservano, si utilizzano o si trasportano sostanze chimiche genotossiche, mutagene e/o cancerogene. Queste sostanze dovrebbero essere tenute, separate dalle altre, in un armadietto chiuso a chiave che sarà contraddistinto dall'indicazione "**Pericolo - cancerogeni chimici**". I locali dove si conservano queste sostanze o dove queste vengono utilizzate dovrebbero essere identificate con la stessa dicitura "**Pericolo - cancerogeni chimici**". Come ulteriore precauzione si potrebbe applicare un logo specifico per queste sostanze.*

Acquisto e conservazione di grandi quantità di sostanze cancerogene

In un istituto o edificio che fa parte di una struttura più grande, lo stoccaggio di queste sostanze deve essere fatto in un unico locale, infatti disperderle in più edifici non solo è inutile, ma può aumentare il fattore di rischio. Dovrà essere nominato un responsabile in ogni istituto con l'incarico di seguire gli ordini e le registrazioni riguardanti tali sostanze. I depositi dovranno essere il più vicino possibile ai laboratori dove verranno preparate le soluzioni madri per evitare la possibilità di dispersione dei composti durante il trasporto.

Il responsabile dovrà redigere un inventario delle entrate in modo da evitare inutili doppioni di tali tossici nello stesso istituto. Ogni composto verrà identificato da un numero (in modo da facilitarne il ritrovamento) che dovrà essere registrato su un apposito registro contenente almeno le seguenti informazioni:

- Nome comune del prodotto.
- Origine commerciale.

- Data di arrivo.
- Quantità in entrata.
- Nominativo di chi ha ordinato il composto.
- Quantità prelevata, quando e da chi.
- Numero assegnato al composto e la sua collocazione nel magazzino.

In più dovranno essere conservate le “schede prodotto” con le principali caratteristiche:

- Nome ufficiale, formula chimica, numero di CAS per facilitarne la registrazione su computer.
- Proprietà chimico-fisiche, tossicologiche e tossicità per l’ambiente.
- Metodo di conservazione e modalità d’impiego.

I composti (sia allo stato liquido che solido) ricevuti nei loro contenitori originali e registrati, dovranno essere conservati in contenitori resistenti agli urti e alle sostanze che dovranno contenere. A questo scopo risulta molto vantaggioso utilizzare contenitori in acciaio inossidabile per la facilità con cui possono essere decontaminati.

Il deposito di sostanze dovrebbe essere un locale chiuso a chiave e situato in un’area ben ventilata; all’interno verranno posizionati armadi ventilati con un sistema di filtrazione dell’aria, frigoriferi o congelatori a seconda delle necessità. L’accesso al deposito deve essere limitato alle persone autorizzate e adeguatamente formate per lavorare con questi composti. L’area dovrà essere classificata come "**A rea controllata**" e dovrà essere contrassegnata da uno specifico simbolo vicino alla scritta "**Pericolo-sostanze cancerogene**".

Il responsabile dell’area o del deposito dovrà consegnare la chiave solo alle persone autorizzate e dovrà accertarsi che venga adeguatamente compilato il registro di carico-scarico.

Nel caso in cui l’istituto sia provvisto di un sistema di accesso a codice a barre alle varie aree dell’edificio, l’accesso al magazzino e all’area di pesata di questi composti dovrà dipendere da tale sistema consentendo quindi l’apertura della porta solo al personale autorizzato. Comunque, un simbolo speciale fuori dal laboratorio dovrà segnalare

il possibile pericolo al personale ed alle persone di passaggio.

I composti cancerogeni, mutageni, genotossici e più in generale tutti i tossici allo stato gassoso dovranno essere utilizzati in laboratori appositamente attrezzati.

Dopo averle prese in consegna e registrate, queste sostanze dovranno essere conservate nelle confezioni originali in locali speciali, adeguatamente ventilati, dotati di un sistema di ventilazione forzata che permetta l'aspirazione dei gas la cui efficienza sia stata testata e certificata. Tutti gli apparati elettrici dovranno essere collegati "a terra" (inclusi frigoriferi e congelatori). I contenitori devono essere chiusi ermeticamente e periodicamente controllati. Devono essere tenuti lontano da fonti di calore e di elettricità statica.

Così come per i composti solidi e liquidi, l'area sarà classificata come "**Area controllata**". I responsabili di tale area dovranno consegnare le chiavi solo al personale autorizzato e assicurarsi che il registro di carico e scarico sia stato adeguatamente compilato. Un simbolo speciale dovrà segnalare il possibile pericolo agli utenti ed alle persone esterne al laboratorio.

Preparazione e conservazione delle soluzioni madri

Nelle aree in cui vengono conservati i composti cancerogeni non diluiti possono accedere solo le persone autorizzate dai responsabili. Queste persone dovranno essere adeguatamente protette (camice, guanti, maschere, ...). L'adeguatezza dei Dispositivi di Protezione Individuale indossati dipenderà di volta in volta dallo stato fisico del composto utilizzato.

Dopo il prelievo dei composti dall'armadio in cui sono conservati, queste sostanze devono essere trasportate nel locale dove si preparano le soluzioni (preferibilmente sotto cappa chimica o sotto cappa a flusso laminare con filtri a carbone attivo). Bisogna prelevare un'aliquota per la preparazione della soluzione madre. Se il locale non è vicino al ma-

gazzino, le sostanze devono essere trasportate in contenitori con il loro contenitore (provette, beute chiuse) all'interno di un ulteriore contenitore infrangibile a chiusura ermetica in grado di garantire adeguata protezione anche in caso di caduta al suolo. All'interno di questo contenitore verrà messo del materiale assorbente come ad esempio la vermiculite, capace di limitare la diffusione di aerosol al momento dell'apertura del contenitore a seguito di incidente.

Se queste sostanze sono conservate in frigoriferi o congelatori, è utile prelevarle in anticipo in modo da portarle a temperatura ambiente senza aprire i flaconi. Questo accorgimento evita la formazione di condensa che potrebbe comportare un errore di pesata (soprattutto per i composti igroscopici) o la decomposizione di quelle sostanze che sono instabili in presenza di acqua.

Per permettere ai flaconi di raggiungere la temperatura ambiente, si deve posizionarli in un bacino di contenimento (si possono usare a tale scopo lavandini in acciaio inossidabile perché hanno il vantaggio di essere facilmente decontaminati, si possono usare anche lavandini smaltati purchè la loro superficie sia intatta) coperto con della carta assorbente plastificata su un lato (il lato resistente all'acqua rivolto verso la superficie del lavandino, quello assorbente verso il flacone). Se il composto è fotosensibile si deve riparare il flacone dalla luce. Durante tutte queste operazioni la cappa aspirante deve essere mantenuta chiusa.

Quando si preleva un'aliquota non si deve tentare di prenderne una quantità esatta: se ne preleva una quantità approssimativa e poi si aggiunge il volume di solvente necessario a raggiungere la concentrazione desiderata. Cercare di aggiustare il peso aggiungendo o togliendo aliquote del composto aumenta il rischio di contaminazione.

L'aliquota prelevata viene messa in un recipiente di volume sufficiente alla prima diluizione. Questo recipiente deve essere provvisto di un tappo a vite e pesato, con il tappo, prima di aggiungere il prodotto desiderato. In alcuni laboratori le procedure di sicurezza suggeriscono di mettere la bilancia sotto cappa, ci sono però 2 svantaggi: 1) è molto difficile, se non impossibile pesare sotto una cappa in funzione, 2) in caso di incidenti (ad esempio stravasi) la bilancia ne risulterà contaminata ed è molto difficile decontaminarla. Comunque è consigliabile posizionare la bilancia il più vicino possibile alla cappa, ma non sotto di essa.

Dopo aver trasferito il campione nel recipiente lo si deve chiudere immediatamente. Determinare il peso dell'aliquota per doppia pesata e quindi calcolare la quantità di solvente necessaria alla prima diluizione (le procedure di sicurezza vanno adattate al tipo di prodotto usato).

Sul flacone viene apposta un'etichetta riportante le seguenti informazioni: nome del composto, natura del solvente, concentrazione, data di preparazione, nome dell'operatore.

Dopo aver preparato la soluzione madre, chiudere il flacone del composto e riportarlo nel deposito adottando le stesse precauzioni di quando lo si è prelevato.

Dopo la preparazione della soluzione madre, i flaconi correttamente etichettati devono essere messi in contenitori provvisti di un agente adsorbente (ad es. vermiculite e simili...), infrangibili e con chiusura a tenuta. Questi contenitori possono essere trasportati nei laboratori ed utilizzati per conservare le sostanze nei frigoriferi (antiesplorazione e dotati di sistema di allarme).

Trasporto dei cancerogeni

Consideriamo due possibili situazioni: il trasporto di cancerogeni e mutageni all'interno dell'edificio dove verranno usati ed il trasporto da un istituto ad un altro, per via aerea, ferroviaria o su strada.

Trasporto dei cancerogeni all'interno dei laboratori

Il trasporto può essere effettuato solo dai laboratori che sono attrezzati e strutturati per l'uso di queste sostanze ed il cui personale sia consapevole della pericolosità dei cancerogeni e dei mutageni.

Per evitare che queste sostanze si disperdano nell'ambiente di lavoro i flaconi che le contengono devono essere messi in contenitori a tenuta ermetica e dotati di una chiusura che non si apra anche in caso di caduta. All'interno del contenitore come detto dovrà essere presente un materiale adsorbente come la vermiculite.

Si preferisce trasportare queste sostanze in contenitori in acciaio inossidabile perché, in caso di rottura accidentale dei flaconi durante il trasporto, hanno il vantaggio di poter essere decontaminati facilmente

con gli agenti chimici adatti.

Trasporto dei cancerogeni fuori dai laboratori

Il trasporto deve garantire la sicurezza di tutte quelle persone che non possono essere a conoscenza del pericolo connesso a queste sostanze e per questo più vulnerabili. Pertanto si devono adottare tutte le precauzioni necessarie ad evitare incidenti e se questi dovessero accadere si deve provvedere a minimizzare il rischio che tali persone vengano coinvolte. Di seguito sono riportate le precauzioni da adottare:

- a) Il composto deve essere messo in una provetta provvista di tappo a vite e, per evitare l'apertura accidentale, assicurare con nastro adesivo o parafilm arrotolato in senso contrario a quello di chiusura.
- b) La provetta è poi messa in un recipiente di plastica a bocca larga, provvisto di un agente adsorbente che ha 2 scopi: il controllo dell'adsorbimento e adsorbire il prodotto in caso di rottura della provetta.
- c) Il recipiente deve poi essere messo in una scatola che lo protegga dagli urti (in polistirene o semplicemente riempita con trucioli di polistirene).

Il trasporto su strada deve essere effettuato in osservanza dell'accordo Europeo del 30 Settembre 2000 riguardante il trasporto di merci pericolose su strada.

Il trasporto aereo deve seguire le regole IATA.

Precauzioni nell'uso di cancerogeni chimici

Le procedure d'uso dei cancerogeni chimici dovrebbero essere adeguate alle proprietà fisico-chimiche dei composti. Possiamo prefigurare tre possibilità:

- 1) Composti volatili (lavorare sotto cappa ed usare incubatori).
- 2) Composti non volatili.
- 3) Polveri elettrostatiche.

Campionamento di cancerogeni volatili

Il prelievo di aliquote di un cancerogeno volatile da contenitore

principale deve essere sempre fatto sotto cappa¹, dotata di filtro a carbone attivo e mantenuta ad una pressione inferiore rispetto a quella del laboratorio. La velocità minima raccomandata dal “U.S. Department of Health and Welfare” è di 0.5 m/s². È molto importante assicurarsi che il piano di lavoro sotto cappa sia occupato solo dalle attrezzature strettamente indispensabili al prelievo. Troppi strumenti potrebbero generare delle turbolenze che possono essere causa di un ritorno di vapori del cancerogeno ed esporre quindi l’operatore agli effetti nocivi di questi.

L’operatore deve indossare abiti di protezione di un colore diverso da quello usato negli altri laboratori, degli occhiali protettivi e guanti adatti al tipo di composto utilizzato³.

Il flacone contenente il cancerogeno viene poi messo in una bacinella (è bene che sia di acciaio inossidabile perché ha il vantaggio di poter essere facilmente decontaminabile, nel caso sia smaltato bisogna assicurarsi che lo smalto sia intatto) coperto con carta assorbente plastificata su un lato (il lato resistente all’acqua rivolto verso la bacinella, quello assorbente verso il flacone).

Quando si lavora con composti ad alta tensione di vapore è meglio indossare una maschera pieno facciale collegata ad un autorespiratore.

Uso di cancerogeni volatili in un incubatore

Quando si utilizza un cancerogeno in un incubatore (per esempio un incubatore per piastre Petri per test di mutagenesi), bisogna per prima cosa assicurarsi che sia collegato ad un sistema di aspirazione. Prima di aprire l’incubatore, bisogna far aspirare l’aria per almeno 30 minuti in modo da eliminare tutte le sostanze che possono essere evaporate. L’aspirazione deve essere lasciata in funzione anche durante il prelievo delle piastre. L’acqua deve essere considerata come un rifiuto inquinato e trattata come tale.

1 La cappa dovrebbe essere lasciata sempre in funzione. Se non fosse possibile, l’aspirazione dovrà essere accesa almeno per un’ora dopo il prelievo.

2 Sentire il rumore del motore aspirante non è sufficiente per ritenere che la cappa funziona correttamente. È bene che nelle cappe siano installati dei misuratori di flusso dell’aria con allarme acustico e visivo qualora non fosse garantito il corretto funzionamento

3 Vedere la sezione sottostante riguardante l’uso dei guanti.

Uso di composti non volatili

Il prelievo di un'aliquota di un cancerogeno chimico non volatile dal contenitore originale dovrà essere fatto sotto cappa¹ con le precauzioni viste prima, dotata di filtri HEPA e mantenuta ad una pressione inferiore rispetto al laboratorio. La velocità minima raccomandata dal "U.S. Department of Health and Welfare" è di 0.5 m/s². Troppi strumenti potrebbero generare delle turbolenze che possono essere causa di un ritorno di vapori/particelle del cancerogeno ed esporre quindi l'operatore agli effetti nocivi di questi.

L'operatore deve indossare abiti di protezione di un colore diverso da quello usato negli altri laboratori, degli occhiali protettivi e guanti adatti al tipo di composto utilizzato³.

Il flacone contenente il cancerogeno viene poi messo in una bacinella di ritenzione (è bene che sia di acciaio inossidabile perché ha il vantaggio di poter essere facilmente decontaminato, nel caso sia smaltato bisogna assicurarsi che lo smalto sia intatto) coperto con carta assorbente plastificata su un lato (il lato resistente all'acqua rivolto verso la bacinella, quello adsorbente verso il flacone).

Prelevare polveri elettrostatiche

Il prelievo di un'aliquota di un cancerogeno chimico nella forma di una polvere con proprietà elettrostatiche (ad esempio le aflatossine) dal contenitore originale deve sempre essere fatto sotto una cappa¹ dotata di filtri HEPA e mantenuta ad una pressione inferiore rispetto al laboratorio. La velocità minima raccomandata dal "U.S. Department of Health and Welfare" è di 0.5 m/s², perché un flusso di aria troppo intenso favorisce la dispersione della polvere. Troppi strumenti possono generare delle turbolenze, possibile causa di un ritorno di vapori/particelle del cancerogeno ed esporre quindi l'operatore agli effetti nocivi di questi.

L'operatore deve indossare abiti di protezione di un colore diverso da quello usato negli altri laboratori, occhiali protettivi, guanti di cotone e una maschera. L'uso di guanti in lattice o vinile favorisce la dispersione della polvere per elettricità statica, dovranno quindi essere indossati con sopra un paio di guanti monouso in cotone. Dopo la dissoluzione della polvere si devono indossare guanti adatti al tipo di composto usato³.

Il flacone contenente il cancerogeno viene poi messo in un lavandino di ritenzione (è bene che sia di acciaio inossidabile perché ha il vantaggio di poter essere facilmente decontaminato, nel caso sia smaltato bisogna assicurarsi che lo smalto sia intatto) coperto con carta assorbente plastificata su un lato (il lato resistente all'acqua rivolto verso il lavandino, quello adsorbente verso il flacone).

Rischi connessi al tipo di guanti

Numerosi studi hanno dimostrato la permeabilità dei guanti a determinate sostanze. Questa permeabilità dipende dal materiale di cui sono fatti i guanti. Il tempo di protezione è legato sia alla resistenza ad agenti chimici/solventi del materiale di cui sono costituiti, sia al loro spessore.

I prodotti cancerogeni e/o quelli mutageni possono anche diffondere attraverso i guanti come dimostrato diversi studi. Questa diffusione dipende dalla natura del composto, ma anche dal solvente usato per la sua dissoluzione.

Nel 1977, [Weeks e Dean](#) hanno dimostrato che le ammine aromatiche possono passare attraverso il materiale dei guanti come tali o in soluzione di metanolo ([Tabella 1](#)). Dopo mezz'ora di contatto con anilina non diluita, si sono trovati 67 mg di anilina nella soluzione all'interno di guanti chirurgici in lattice.

Diversi laboratori hanno studiato le N-nitrosammine ([Gough et al., 1978](#); [Sansone & Tewari, 1978](#); [Walkers et al., 1978](#)). Si è visto che sono in grado di diffondere attraverso i guanti in lattice sia nella forma non diluita che in soluzione di cloruro di metilene ([Walkers et al., 1978](#)). In 4 minuti, 5-15 mg di N-nitroso-dimetil-ammina (NDMA) o di N-nitroso-dietil-ammina depositate sul lato esterno di un paio di guanti in lattice sono passati nella soluzione salina posta all'interno. Per aumentare la protezione, si possono usare due paia di guanti separate da uno strato di talco ([Tabella 2](#)) o da uno strato di crema. Nello studio della NMDA si è visto che usando due paia di guanti separati da uno strato di talco il passaggio alla soluzione salina, dopo 4 minuti di contatto, diminuisce di circa 0,5 mg (cioè di un fattore >10). Se invece le due paia di guanti sono separate da uno strato di crema non si è rilevato alcun passaggio. Similmente, la diffusione di NMDA in soluzione di cloruro

di metilene è ridotto da circa l'8% in 10 minuti a circa lo 0,5% usando un paio di guanti in lattice separati da uno strato di crema.

Questo permette di aumentare il periodo di tempo utile per cambiarsi i guanti esterni, quando vengano contaminati. [Gough et al. \(1978\)](#) hanno scoperto che le N-nitroso-ammine in soluzione di esano diffondono attraverso i guanti in vinile e lattice, mentre le N-nitroso-pirrolidine passano rapidamente in ogni caso. [Sansone e Tewari \(1978\)](#) hanno inoltre dimostrato che i guanti di lattice, PVC e neoprene sono permeabili alle nitrosammine. Però se queste sostanze sono sciolte in cloruro di metilene diffondono attraverso tutti i tipi di guanti, se sciolte in acetone, i guanti in lattice permettono una protezione migliore, ma non completa.

Per le soluzioni di etanolo, i guanti in nitrile, e neoprene rappresentano la protezione migliore. Infine si è visto che per quanto riguarda le soluzioni acquose, solo i guanti in nitrile sono permeabili ad esse.

Dal momento che le N-nitrosammine in soluzione sono molecole piccole, ci si potrebbe stupire del fatto che ci sia il rischio di passaggio di molecole più grandi. [Castegnaro et al. \(1982\)](#) hanno studiato il comportamento di aflatossine sciolte in dimetilsolfossido o in cloroformio. Quando vengono sciolte in dimetilsolfossido, le aflatossine passano attraverso i guanti in lattice, ma non attraverso quelli in vinile, mentre se vengono sciolte in cloroformio passano attraverso entrambi i tipi di guanti perché il cloroformio scioglie il materiale di cui sono costituiti.

Due studi americani hanno dimostrato che una serie di agenti antineoplastici (alcuni dei quali sono cancerogeni o potenzialmente cancerogeni per l'uomo) diffondono attraverso i guanti. Ciò che [Connor et al. \(1984\)](#) ha dimostrato con due metodi diversi (analisi chimiche e test di mutagenesi) è che la carmustina diffonde sia attraverso i guanti in lattice, che quelli in vinile e che, effettivamente, indossare due paia di guanti garantisce una protezione migliore. [Laidlow et al. \(1984\)](#) ha studiato il comportamento di 20 agenti neoplastici (carmustina, ciclofosfamide, ifosfamide, mercaptopurina, melphalan, tiotepa, mitoxantrone, dacarbazina, etoposide, teniposide, 5-fluoro uracile, floxuridina, cisplatino, daunorubicina, mecloretamina, doxorubicina, bleomicina, ...) verso 4 tipi di guanti. Il test è durato 90 minuti utilizzando le soluzioni raccomandate dai fornitori. I risultati sono i seguenti:

- Guanti in PVC sottili: permeabili a tutti i composti saggiati

- Guanti in PVC spessi: permeabili a 4 prodotti (carmustina, tiotepa, mecloretamina e daunorubicina): leggermente permeabili a doxorubicina e mercaptopurina
- Guanti in lattice: permeabili a 4 prodotti (carmustina, tiotepa, mecloretamina e ciclofosfamide)
- Guanti chirurgici in lattice: permeabili al tiotepa

[Connor et al. \(1999\)](#) ha dimostrato l'efficienza nella protezione dei guanti in nitrile (spessore di 0.1-0.15 mm), in lattice (spessore di 0.18-0.22 mm), in poliuretano (spessore di 0.13-0.15 mm) contro il passaggio di 18 soluzioni di farmaci antineoplastici preparati in accordo alle specifiche dei fornitori. Il test è stato eseguito per diversi intervalli di tempo: 30, 60, 90 e 120 minuti. Nel caso dei guanti in nitrile si è verificata la diffusione di più del 5% di tiotepa in 30 minuti ma questo fenomeno è stato attribuito alla presenza di microfori. Quindi è molto importante verificare visivamente i guanti per evitare questo tipo di problemi. Per gli altri 11 guanti in nitrile non si è verificato nessun passaggio di farmaci. Per un campione di ciascun tipo di guanti (lattice, poliuretano e vinile) è stata notata una permeabilità < 1%. Un solo campione di guanti in lattice si è dimostrato permeabile alla carmustina dopo 90 minuti di contatto. Il tassotere diffonde attraverso il poliuretano in 60 minuti ed attraverso il neoprene in 120 minuti. Si può quindi dedurre che, a parte il problema dei microfori, i 4 tipi di guanti esaminati sono accettabili per maneggiare i 18 farmaci considerati entro 30 minuti, tempo massimo oltre il quale è necessario cambiarsi i guanti.

Questi studi hanno dimostrato che tutti i composti, inclusi i cancerogeni, possono diffondere attraverso i guanti quando sono disciolti in un solvente che è in grado di reagire con il materiale dei guanti. In più, diverse sostanze allo stato liquido possono diffondere attraverso i guanti. Quindi è necessario essere molto prudenti quando si maneggiano questi composti e soprattutto cambiarsi immediatamente i guanti non appena si verifici una contaminazione.

Già nel 1987, [Turjanmaa](#) aveva riferito di gravi casi di reazioni allergiche ai guanti in lattice da parte del personale sanitario in Finlan-

dia. Questa notizia fu la prima di una lunga serie riguardante diverse professioni mediche (ricercatori, medici, infermieri, tecnici di laboratorio), ma anche pazienti negli Stati Uniti, in Canada, Francia, Belgio, Spagna, Olanda, Israele, Taiwan. Le manifestazioni cliniche comprendevano orticaria, dermatiti, shock anafilattico, problemi respiratori come asma, riniti, congiuntiviti. La prevenzione dovrebbe comprendere l'uso di sottoganti in cotone o vinile, desensibilizzazione, l'uso di guanti privi di talco e per alcuni il cambio di lavoro (Hudgins et al., 1993; Salkie, 1993, Yassin et al., 1994; Tarlo et al., 1994; Swanson et al., 1994; Moneret-Vautrin et al., 1994; Rustmeyer et al., 1994; ; Vandенplас et al., 1995; Ortiz et al., 1995; Hunt et al., 1999; Estlander et al., 1996; Katelaris et al., 1996; Liss et al., 1997; Ylitalo et al., 1997; Lai et al., 1997; De Groot et al., 1998; Vila et al, 1999; Levy et al., 1999; Charous et al., 2000; Tarlo, 2001).

Tabella 1. Diffusione delle ammine aromatiche attraverso i guanti (da Week & Dean, 1987)

* MOCA : Bis-metilene (2-cloroanilina)

AMMINE AROMATICHE	CONCENTRAZIONE	PRIMO VALORE DI CONCENTRAZIONE DOPO LA DIFFUSIONE (µg/ML)	TEMPO DI DIFFUSIONE (ORE)
Anilina	2.400	22	18,0±2,0
Anilina	11.000	8	1,75±1,0
Anilina	Pura	67	0,50±0,25
MOCA*	1.900	29	2,00±0,50
MOCA*	9.800	37	1,5±0,5

Tabella 2. Guanti e N-nitrosammine, diffusione attraverso due paia di guanti separati da uno strato di talco.

TEMPI (MIN)	NITROSAMMINE ESAMINATE (% DI DIFFUSIONE)						
	NDMA	NDEA	NDPA	NDBA	NMPA	NPIR	NPIP
2	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	0,4	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	2,3	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	0,15
20	2,5	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	0,2
30	4,1	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	1,9	0,3

NDMA: N-nitrosodimetilammina
NDEA: N-nitrosodietilammina
NDPA: N-Nitrosodipropilammina
NDBA: N-nitrosodibutilammina
NPIP: N-nitrosopiperidina
NPIR: N-nitospirrolidina

Bibliografia

- Barbeito M.S. Laboratory design and operation procedures for chemical carcinogen use. ACS symposium series N° 96, Toxic chemical and explosives facilities, Ralph A. Scott, Jr (Ed.). (1979).
- Castegnaro M., Sansone E.B. Chemical carcinogens: some guidelines for handling and disposal in the laboratory. Spinger Verlag, Berlin. (1986).
- Castegnaro M., Van Egmond H.P., Paulsch W.E., Michelon J. Limitations in protection afforded by gloves in laboratory handling of aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65: 1520-1523. (1982).
- Charous B.L., Schuenemann P.J., Swanson M.C. Passive dispersion of latex aeroallergen in a healthcare facility. Ann Allergy Asthma Immunol, 85: 285-290. (2000).
- Colligan S.A, Horstman S.W. Permeation of cancer therapeutic drugs through glove materials under static and flexed conditions. Applied Occupational and Environmental Hygiene, 5: 848-852. (1990).
- Conférence internationale du travail, Recommandation 147 : Recommandation concernant la prévention et le contrôle des risques professionnels causés par les substances et agents cancérigènes, 24 juin 1974.
- Connor T.H. et al. Permeability of latex and polivinyl glove to carmustine. American Journal of Hospital Pharmacy, 41: 676-679. (1984)
- Connor T.H. Permeability of nitrile rubber, latex, polyurethane and neoprene gloves to 18 antineoplastic drugs. American Journal of Health-System Pharmacy, 56: 2450-2453. (1999).
- De Groot H., De Jong N. W., Duijster E., Gerth Van Wijk R., Vermeulen A., Van Toorenenbergen A.W., Geursen L., Van Joost T. Prevalence of natural rubber latex allergy (type I and type IV) in laboratory workers in The Netherlands. Contact Dermatitis, 38: 159-163. (1998).
- DHEW Laboratory chemical carcinogen safety standards subcommittee of the DHEW committee to coordinate toxicology and related programs : Guidelines for the laboratory use of chemical substances posing a potential occupational carcinogenic risk. May 2, 1979. (1979).
- ECETOC Monograph N° 2, Septembre 1980 : A contribution to the strategy for the identification and control of occupational carcinogens. (1980).
- ECETOC Monograph N° 3, Janvier 1982 : Risk assesment of occupational chemical carcinogens. (1982).

- Estlander T., Jolanki R., Kanerva L. Rubber glove dermatitis: a significant occupational hazard-prevention. *Curr Probl Dermatol*, 25: 170-176. (1996).
- Gough T.A., Webb K.S., McPhail M.F. Diffusion of nitrosamines through protective gloves. In: Environmental aspects of N-nitroso compounds Walker E.A, Castegnaro M., Griciute L., Lyle R.E. Editors, IARC Scientific Publications N° 19, 531-534. (1978).
- Hudgins LB, Hamdy RC, Miller MP. Anaphylaxis due to latex. *South Med J.*, 86: 948-949. (1993).
- Hunt L.W., Fransway A.F., Reed C.E., Miller L.K., Jones R.T., Swanson M.C., Yunginger J.W. An epidemic of occupational allergy to latex involving health care workers. *J Occup Environ Med*, 37 : 1204-1209. (1999).
- INRS ED 490 : Sécurité dans les manipulations scientifiques. (1982).
- INRS, ND 1178-95-79 Travaux dans les Laboratoire de Chimie. 2. Stockage des produits chimiques.
- INRS, ND 1313-103-81 Travaux dans les laboratoires de chimie. 1. Données de bases relatives aux travaux dans les laboratoires de chimie.
- INRS, ND 1320-103-81 : Affiches, consignes, avis et pancartes réglementaires.
- INRS, ND 1543-120-85 Prévention des cancers d'origine professionnelle. Circulaire du 14 mai 1985. (J.O. du 6 juin 1985).
- Katelaris C.H., Widmer R.P., Lazarus R.M. Prevalence of latex allergy in a dental school. *Med J Aust*, 164: 711-714. (1996).
- Lai C.C., Yan D.C., Yu J., Chou C.C., Chiang B.L., Hsieh K.H. Latex allergy in hospital employees. *J Formos Med Assoc*, 96: 266-271. (1997).
- Liss G.M., Sussman G.L., Deal K., Brown S., Cividino M., Siu S., Beezhold D.H., Smith G., Swanson M.C., Yunginger J., Douglas A., Holness D.L., Lebert P., Keith P., Wasserman S., Turjanmaa K. Latex allergy: epidemiological study of 1351 hospital workers. *Occup Environ Med*, 54 : 335-342. (1997).
- Laidlow J., Connors T.H., Theiss J.C., Anderson R.W., Matney T.S. Permeability of latex and polyvinyl glove to 20 antineoplastic agents. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 41: 2613-2623. (1984).
- Levy D., Allouache S., Chabane M.H., Leynadier F., Burney P. Powder-free protein-poor natural rubber latex gloves and latex sensitization. *JAMA*, 281: 988. (1999).
- Moneret-Vautrin D.A., Debra J.C., Kohler C., STringini R., Kanny G., Guillaumot A., Buthmann D. Occupational rhinitis and asthma to latex. *Rhinology*, 32: 198-202. (1994).
- Montesano R., Bartsch H., Boyland E., Della Porta G., Fishbein L., Griesemer G., Swan A.B., Tomatis L. IARC Handling chemical carcinogens in the laboratory: Problems of safety. Editors IARC scientific publications N° 33. Pp 32. (1979).
- NIH National cancer institute safety standards for research involving chemical carcinogens. DHEW Publication N° (NIH)75-900, 2 june 1975. (1975).
- NIH guidelines for the laboratory use of chemical carcinogens US department of health and human services, National Institutes of Health, Washington. Pp 15. (1981).
- OMS Manuel de sécurité biologique en laboratoire, 1984. (1984).
- Ortiz J.R., Garcia J., Archilla J., Criado A. Latex allergy in anesthesiology. *Rev Esp Anestesiol Reanim*, 42: 169-174. (1995)

- Picot A., Castegnaro M. Risques liés à la manipulation des produits cancérogènes. Partie B. L'Actualité Chimique, Janvier-Février: 79-85. (1989)
- Picot A., Grenouillet P. La sécurité en laboratoire de chimie et biochimie. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 2nd Ed. (1992)
- Picot A. Information Toxicologique n° 4 : Liste provisoire de quelques cancérogènes chimiques pour l'Homme. CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles - Gif sur Yvette. (1988)
- Picot A. Information Toxicologique n° 5 : les agents alkylants : cancérogènes potentiels pour l'Homme ? CNRS, Institut de chimie des substances naturelles, Gif sur Yvette. (1988)
- Picot A., Zerbib J.C., Castegnaro M. Risques liés à la manipulation des produits cancérogènes et réglementation française sur les produits cancérogènes; Partie D: listes réactualisées des principaux produits génotoxiques utilisés dans les laboratoires. L'actualité chimique, Juillet Aout Septembre 1993: 44-49. (1993).
- Rappaport S.M., Campbell E.E. The interpretation and application of OSHA carcinogen standards for laboratory operations. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 37, December 1976. (1976).
- Rousselin X., Dayan- Kenigsberg J., Pleven C., Castegnaro M., Picot A., Zajdela F. Manipulation des substances génotoxiques utilisées au laboratoire, prévention et sécurité. Publication INRS, Ligne Prévention. (1994).
- Rustemeyer T, Pilz B, Frosch P.J. Contact allergies in medical occupations. Hautarzt, 45: 834-844. (1994).
- Salkie M.L. The prevalence of atopy and hypersensitivity to latex in medical laboratory technologists. Arch Pathol Lab Med., 117: 897-899. (1993).
- Sansone E.B., Poiley J.A., Pienta R.J., Lebherz W.B. Potential hazard of tissue culture assays arising from carcinogenic compounds incompletely removed by washing. Cancer Research, 36: 2455-2458. III (1976).
- Sansone E.B., Tewari Y.B. The permeability of laboratory gloves to selected nitrosamines. In: Environmental aspects of N-nitroso compounds, Walker E.A., Castegnaro M, Gričiute L., Lyle R.E. Editors, IARC Scientific Publication N° 19: 535-543. (1978).
- Segal A., Loewwengart G. Laboratory of organic chemistry and carcinogenesis, Institute of environmental medicine, New-York, N.Y. 10016. Development of personnel monitoring device for the detection of direct-acting alkylating agents.
- Slevin M.L., Ang L.M., Johnston A. et al. Permeability of latex and polyvinyl gloves used in handling cytotoxic drugs. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 12: 151-153. (1984).
- Stoikes M.E., Carlson J.D., Farris F.F. et al. Permeability of latex and polyvinyl gloves to fluorouracil and methotrexate. American Journal of Hospital Pharmacy, 44: 1341-1346. (1987).
- Société Française de Toxicologie Génétique D. Marzin ed., Training module No. 2, WHO publication WHO/PCS/98.9 (1998).
- Société Française de Toxicologie Génétique Manipulation des produits mutagènes et cancérogènes au laboratoire, D. Marzin éditeur, Edition INSERM, série «Prévention en laboratoires de recherche». (1998).

- Swanson M.C., Bubak M.E., Hunt L.W., Yunginger J.W., Warner M.A., Reed C.E. Quantification of occupational latex aeroallergens in a medical center. *J Allergy Clin Immunol*, 94: 445-451. (1994).
- Tarlo S.M. Natural rubber latex allergy and asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 7, 27-31. (2001)
- Tarlo S.M., Sussman G., Contala A., Swanson M.C. Control of airborne latex by use of powder-free latex gloves. *J Allergy Clin Immunol*, 93: 985-989. (1994).
- Thomas P.H., Fenton-May V. Protection afforded by various gloves to carmustine exposure. *Pharmaceutical Journal*, 238 : 775-777. (1987).
- Turjanmaa K. Incidence of immediate allergy to latex gloves in hospital personnel. *Contact Dermatitis*, 17, 270-275. (1987).
- Vandenplas, O., Delwiche, J., P., Evrard, G., Aimont, P., Van Der Brempt, X., Jamart, J., Delaunois, L. Prevalence of occupational asthma due to latex among hospital personnel. *Am J Respir Crit Care Med*, 151: 54-60. (1995).
- Vila, L., Sanchez, G., Ano, M., Uasuf, C., G., Sanz, M., L. Risk factors for latex sensitization among health care workers. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 9: 356-360. (1999).
- Walkers, E., A., Castegnaro, M., Garren, L., Pignatelli, B. Limitation of the protective effect of rubber gloves. In: *Environmental aspects of N-nitroso compounds*, Walker, E., A, Castegnaro, M, Gričiuote, L., Lyle, R., E. Editors, IARC Scientific Publication N° 19: 535-543. (1978).
- Weeks, R., W., Deans, B., J. Permeation of methanolic aromatic amine solutions through commercially available glove materials. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 38: 721-727. (1977).
- Yassin, M., S., Lierl, M., B., Fischer, T., J., O'Brien, K., Cross, J., Steinmetz, C. Latex allergy in hospital employees. *Ann Allergy*, 72: 245-249. (1994).
- Ylitalo, L., Turjanmaa, K., Palosuo, T., Reunala, T. Natural rubber latex allergy in children who had not undergone surgery and children who had undergone multiple operations. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 606-612. (1997).

CONTAMINAZIONI ACCIDENTALI CON SOSTANZE CHIMICHE CANCEROGENE E PROCEDURE DI EMERGENZA

Marcel Castagnaro

In caso di versamento accidentale i primi obiettivi sono proteggere i lavoratori e isolare l'area, solo successivamente si procede alla decontaminazione dell'area. In caso di versamento devono essere prese in considerazione due alternative: 1) rovesciamento di un composto volatile 2) rovesciamento di un composto sotto forma di polvere. In tutti i casi le persone che hanno provocato l'incidente devono mantenere il proprio controllo.

Tutte le persone che lavorano con gli agenti cancerogeni devono ricevere un addestramento riguardo ai possibili incidenti. Una persona spaventata è più soggetta ad incidenti di una persona che è stata ben istruita su come affrontare le conseguenze di un incidente.

Nota: la strategia descritta di seguito è teorica e deve essere adattata ad ogni singolo caso. Deve essere prevista durante la pianificazione di un esperimento la corretta procedura di emergenza.

Versamento di composti volatili

Nel caso di rovesciamento di composti volatili il rischio principale per il lavoratore è respirare l'atmosfera inquinata ed essere contaminato per penetrazione cutanea della sostanza. In questi casi il lavoratore deve immediatamente lasciare l'area inquinata, togliendosi tutti gli abiti contaminati nell'area adiacente.

- L'accesso nell'area contaminata e nella zona dove sono stati abbandonati gli abiti contaminati sarà proibito sino ad avvenuta decontaminazione.
- Il lavoratore coinvolto informerà le persone del gruppo di sicurezza, facendo un rapporto sull'incidente, il luogo e le circostanze che lo hanno determinato.
- Il rapporto dovrà includere le seguenti informazioni:

- Nome del composto versato.
- Ammontare del composto versato.
- L'area potenzialmente inquinata.
- L'esatta localizzazione dell'incidente (per esempio se il rovesciamento è nel mezzo di una stanza o all'interno di un frigorifero o su una attrezzatura particolare) e del posto dove i vestiti contaminati sono stati abbandonati.
- La presenza od assenza di un solvente e, in caso di presenza, la natura del solvente (questa informazione è assolutamente necessaria in caso di decontaminazione chimica dell'area inquinata).
- Le persone incaricate della decontaminazione prima di intervenire dovranno acquisire tutta l'attrezzatura necessaria. Questa include:
 - Contenitori capienti abbastanza e con apertura ampia, in grado di contenere tutti i pezzi di vetreria rotta, i guanti, gli indumenti di tessuto utilizzati per pulire l'area, ecc.
 - Una scorta di stracci in tessuto.
 - Una scorta di guanti.
 - Soluzioni acquose lievemente acide o basiche a seconda delle proprietà della sostanza rovesciata.
 - Soluzioni decontaminanti.
- Le persone con il compito di decontaminare dovranno proteggersi prima di iniziare la decontaminazione. La protezione includerà:
 - Tuta intera.
 - Occhiali protettivi.
 - Visiera.
 - Guanti (durante la decontaminazione indossare sempre due paia di guanti, cambiandosi il paio più esterno dopo ogni azione).
 - Protezioni per le vie respiratorie (queste dipendono dal tipo di sostanza, dalla nostra conoscenza sul suo assorbimento al carbone attivo e dalla quantità versata).
 - Copriscarpe.
 - Rotolo di plastica adesiva (ampio circa 0,5 m).

- La prima cosa da fare, dopo aver indossato i Dispositivi di Protezione Individuale, quando si entra nell'area contaminata è localizzare esattamente l'area da contaminare tracciando un cerchio sul pavimento. Il cerchio dovrà essere più grande dell'area effettivamente contaminata (per un piccolo versamento dovrà essere almeno della misura di due braccia e per grossi versamenti tanto quanto necessario). Durante questo periodo di delimitazione, deve essere osservato se gli arredi (armadi, frigoriferi) devono essere decontaminati.
- **Decontaminazione dell'area:** raccogliere tutti i pezzi di vetro rotto e metterli nel contenitore ad ampia apertura usato per la decontaminazione. Cambiarsi i guanti esterni ad ogni pezzo di vetro raccolto e in caso di segni di danneggiamento dei guanti esterni cambiarsi anche quelli interni.

Nota: Se l'area è troppo grossa perché sia possibile l'accesso ad ogni sua parte allungando il braccio, si può posizionare sul pavimento un tappeto plastico adesivo al fine di facilitare l'accesso. Questo può essere fatto pulendo con degli stracci in tessuto l'area davanti al rullo di tappeto adesivo. La superficie di questo tappeto è da considerarsi area pulita su cui camminare.

- Raccogliere il liquido versato con uno straccio di tessuto, iniziando ogni raccolta al margine della contaminazione e finendo nella parte maggiormente contaminata. Ad ogni azione cambiare straccio e guanti esterni. Per grandi volumi di liquido versato usare un agente assorbente quale la vermiculite e successivamente raccoglierlo, sempre cambiando guanti dopo ogni fase.
- Continuare la pulizia dell'area con stracci di tessuto che devono essere bagnati con una soluzione acida o basica; cambiarsi i guanti ad ogni operazione.
- Controllare la superficie cercando eventuali punti non decontaminati perfettamente. La zona maggiormente contaminata verrà sottoposta al "Wipe-test" (strofinare su una superficie determinata una garza e verificare il residuo di contaminazione mediante analisi chimico fisica).
- Se l'area risulta ancora contaminata posizionarvi sopra uno straccio di tessuto imbevuto di soluzione decontaminante in quantità

sufficiente ad inzuppare completamente lo straccio, ma non tale da allagare l'area.

- Lasciar reagire il tempo necessario, rimuovere lo straccio e asciugare.

Nota: tutti i tessuti a questo punto devono essere considerati contaminati

- **Decontaminazione degli arredi:** se è stato osservato un versamento anche sugli arredi questi dovranno essere decontaminati utilizzando la stessa procedura seguita per il pavimento, usando stracci inumiditi di soluzioni acide o basiche se necessario.
- **Decontaminazione dei rifiuti:** questi dovranno o essere bruciati nell'inceneritore, o messi sotto cappa per il trattamento con le tecniche chimiche appropriate.
- Solo a questo punto l'area può essere aperta ai lavoratori.

Versamento di composti in polvere

Nel caso di versamento di composti in polvere i rischi principali per i lavoratori sono la contaminazione dei vestiti da parte di piccole particelle e la disseminazione della polvere nell'atmosfera attraverso il sistema di ventilazione. I lavoratori dovranno lasciare l'area inquinata immediatamente e togliersi i vestiti contaminati nell'area adiacente.

- L'accesso nell'area contaminata e nella zona dove sono stati abbandonati gli abiti contaminati sarà proibito sino ad avvenuta decontaminazione.
- Il lavoratore coinvolto informerà le persone del gruppo di sicurezza, facendo un rapporto sull'incidente, il luogo e le circostanze che lo hanno determinato.
- Il rapporto dovrà includere le seguenti informazioni:
 - Nome del composto versato.
 - Ammontare del composto versato.
 - L'area potenzialmente inquinata.
 - L'esatta localizzazione dell'incidente (per esempio se il rovesciamento è nel mezzo di una stanza o all'interno di un frigorifero o su una attrezzatura particolare) e del posto dove i vestiti contaminati sono stati abbandonati.

- La presenza od assenza di un solvente e, in caso di presenza, la natura del solvente (questa informazione è assolutamente necessaria in caso di decontaminazione chimica dell'area inquinata).
- Le persone incaricate della decontaminazione prima di intervenire dovranno acquisire tutta l'attrezzatura necessaria. Questa include:
 - Contenitori capienti abbastanza e con apertura ampia, in grado di contenere tutti i pezzi di vetreria rotta, i guanti, gli indumenti di tessuto utilizzati per pulire l'area, ecc.
 - Una scorta di stracci in tessuto.
 - Una scorta di guanti.
 - Soluzioni acquose lievemente acide o basiche a seconda delle proprietà della sostanza rovesciata.
 - Soluzioni decontaminanti.
- Le persone con il compito di decontaminare dovranno proteggersi prima di iniziare la decontaminazione. La protezione includerà:
 - Tuta intera.
 - Occhiali protettivi.
 - Visiera.
 - Guanti (durante la decontaminazione indossare sempre due paia di guanti, cambiandosi il paio più esterno dopo ogni azione).
 - Protezioni per le vie respiratorie (queste dipendono dal tipo di sostanza, dalla nostra conoscenza sul suo assorbimento al carbone attivo e dalla quantità versata; in questo caso può essere sufficiente una maschera a conchiglia usa e getta del tipo FFP3SL).
 - Copriscarpe.
 - Rotolo di plastica adesiva (ampio circa 0,5 m).
- La prima cosa da fare, dopo aver indossato i Dispositivi di Protezione Individuale, quando si entra nell'area contaminata è localizzare esattamente l'area da decontaminare tracciando un cerchio sul pavimento. Il cerchio dovrà essere più grande dell'area effettivamente contaminata (per un piccolo versamento dovrà

essere almeno della misura di due braccia e per grossi versamenti tanto quanto necessario). Durante questo periodo di delimitazione, deve essere osservato se gli arredi (armadi, frigoriferi) devono essere decontaminati.

- **Decontaminazione dell'area:** raccogliere tutti i pezzi di vetro rotto e metterli nel contenitore ad ampia apertura usato per la decontaminazione. Cambiarsi i guanti esterni ad ogni pezzo di vetro raccolto e in caso di segni di danneggiamento dei guanti esterni cambiarsi anche quelli interni.

Nota: Se l'area è troppo grossa perché sia possibile l'accesso ad ogni sua parte allungando il braccio, si può posizionare sul pavimento un tappeto plastico adesivo al fine di facilitare l'accesso. Questo può essere fatto pulendo con degli stracci in tessuto l'area davanti al rullo di tappeto adesivo. La superficie di questo tappeto è da considerarsi area pulita su cui camminare.

- Raccogliere la polvere versata con uno straccio inumidito, iniziando ogni raccolta al margine della contaminazione e finendo nella parte maggiormente contaminata. Ad ogni azione cambiare straccio e guanti esterni.
- Continuare la pulizia dell'area con stracci di tessuto che devono essere bagnati con una soluzione acida o basica; cambiarsi i guanti ad ogni operazione.
- Controllare la superficie cercando eventuali punti non decontaminati perfettamente. La zona maggiormente contaminata verrà sottoposta al "Wipe-test" (strofinare su una superficie determinata una garza e verificare il residuo di contaminazione mediante analisi chimico fisica).
- Se l'area risulta ancora contaminata posizionarvi sopra uno straccio di tessuto imbevuto di soluzione decontaminante in quantità sufficiente ad inzuppare completamente lo straccio ma non tale da allagare l'area.
- Lasciar reagire il tempo necessario, rimuovere lo straccio e asciugare.

Nota: tutti i tessuti a questo punto devono essere considerati contaminati.

- **Decontaminazione degli arredi:** se è stato osservato un versamento anche sugli arredi questi dovranno essere decontaminati utilizzando la stessa procedura seguita per il pavimento, usando stracci inumiditi di soluzioni acide o basiche se necessario.
- **Decontaminazione dei rifiuti:** questi dovranno o essere bruciati nell'inceneritore o messi sotto cappa per il trattamento con le tecniche chimiche appropriate.
- Solo a questo punto l'area può essere aperta ai lavoratori.

RISCHIO RADIOLOGICO

Marcel Castegnaro

Introduzione

Nei laboratori di tipo biologico, biomedico e biotecnologico si utilizzano numerose sostanze radioattive. Le più comuni sono:

- Carbonio-14 (^{14}C), usato nella ricerca per garantire che nuovi potenziali farmaci siano metabolizzati senza la formazione di prodotti nocivi.
- Trizio (^3H), usato per studi di biomedicina e metabolismo dei farmaci per garantire la sicurezza di potenziali nuovi farmaci.
- Iodio-125 (^{125}I), usato “in vitro” per kit diagnostici.
- Fosforo-32 (^{32}P), usato in biologia molecolare e nella ricerca genetica.
- Fosforo-33 (^{33}P) e Zolfo-35 (^{35}S), sostituiscono spesso il (^{32}P) per ragioni di sicurezza perché la loro emissione Beta è a bassa energia.

Trattamento del materiale radioattivo

Prima di iniziare a lavorare con radioisotopi, tutti gli operatori devono ottenere l'autorizzazione per il loro utilizzo da parte dell'Esperto qualificato al Rischio Radiologico, il quale si incaricherà di registrarli al Servizio di Sicurezza Radiologica, fornirà il manuale di sicurezza e provvederà alla formazione del personale.

Il manuale dovrà trattare i seguenti punti:

- Le precauzioni necessarie per impedire contaminazioni alle persone e alle strutture e per minimizzare ogni effetto delle radiazioni.
- La sorveglianza sanitaria del personale.
- Le modalità di acquisto e di immagazzinamento di materiale radioattivo.

- Le modalità di smaltimento dei rifiuti radioattivi.

Ogni Istituto deve adattare tale manuale in modo che fornisca le informazioni specifiche sulle stanze autorizzate per l'impiego di materiale radioattivo, sulle aree autorizzate come deposito per i rifiuti radioattivi, sulla lista dei composti e delle attività autorizzate in ogni stanza.

Tutti i radioisotopi devono essere ordinati direttamente dall'Ufficio Responsabile della Sicurezza Radiologica secondo la legislazione in vigore. I singoli lavoratori sono anche responsabili della pulizia della loro area di lavoro, della decontaminazione delle attrezzature e della vetreria e del deposito sicuro di rifiuti radioattivi in accordo con le normative nazionali.

Un apposito registro di carico e di scarico dovrà essere rigorosamente compilato e aggiornato quotidianamente dagli utilizzatori.

Quando si lavora con la radioattività, si deve indossare un camice da laboratorio, guanti e un dosimetro, fornito dall'ente di controllo nazionale e rilasciato dall'Esperto qualificato aziendale. Occhiali protettivi o visiere dovranno essere disponibili per le operazioni a rischio.

Ogni laboratorio autorizzato dovrebbe avere specifiche aree per l'impiego dei radioisotopi. Le massime quantità usate in queste aree devono essere indicate in posizione visibile. Queste aree dovrebbero essere chiaramente segnalate e non dovrebbero essere usate per altri scopi. Un foglio di carta assorbente plastificato su un lato può essere usato per coprire la superficie del banco, con la parte impermeabile appoggiata sul tavolo. L'uso di grandi quantità di ^{32}P (es. $> 100 \mu\text{Ci}$) deve essere confinato in una apposita stanza. L'accesso di questa camera deve essere limitato soltanto a personale autorizzato. Ogni operatore che inizia un esperimento deve controllare la contaminazione dell'ambiente e delle attrezzature deve compilare e firmare un apposito registro della stanza scrivendo l'ora di inizio e di fine esperimento, ed eventuali osservazioni. Alla fine dell'esperimento dovrà ovviamente effettuare un controllo su possibili contaminazioni ambientali ed eventualmente decontaminare l'ambiente di lavoro. Ogni infortunio o incidente dovrà essere rigorosamente segnalato al personale addetto alla sicurezza radiologica e, qualora si trattasse di una contaminazione sull'operatore, al medico incaricato alla sorveglianza sanitaria. Tutte le operazio-

ni con soluzioni liquide che coinvolgono isotopi dovrebbero essere eseguite utilizzando un doppio contenitore.

Quando si utilizzano ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C o ^{35}S si devono utilizzare schermi protettivi di plexiglass, di 1cm di spessore (vedi schede di sicurezza per ogni singolo isotopo). Non si deve tenere la singola provetta contenente ^{32}P tra le dita, ma sempre utilizzarla contenuta in una scarabattola o in un adatto contenitore protettivo (Castegnaro et al., 1993) per limitare l'esposizione delle dita. Le pipettatrici automatiche dovrebbero essere predisposte in modo da avere protezioni per le radiazioni.

È severamente vietato pipettare a bocca durante gli esperimenti con materiale radioattivo.

Durante tali operazioni devono essere compiuti regolari controlli di contaminazione delle mani/dita e, in caso di contaminazione, cambiare i guanti immediatamente.

In ogni caso, dopo aver terminato il lavoro che implica l'uso di un radioisotopo, si deve controllare l'area di laboratorio, ogni attrezzatura usata e la propria persona per evidenziare possibili contaminazioni usando un apparecchio portatile di controllo della radioattività idoneo all'isotopo usato (vedi schede tecniche allegate).

Formazione del personale

Prima di iniziare un lavoro con composti radiomarcati, in modo particolare ^{32}P , o grandi quantità (mCi o più) di elementi radioattivi, tutto il personale dovrebbe essere sottoposto a un periodo di formazione usando soluzioni di composti fluorescenti invece di composti radiomarcati. Gli obiettivi di questi periodi di formazione sono: 1) aiutare il personale a distinguere i diversi tipi di incidenti e contaminazioni che possono accadere e così migliorare il loro controllo; 2) migliorare la loro destrezza mentre lavorano dietro a uno schermo e così ridurre la durata dell'esposizione; 3) migliorare la loro precisione nella campionatura delle varie soluzioni.

Deposito

Il materiale radioattivo deve essere posto in armadietti sicuri o chiusi a chiave, frigoriferi, congelatori o, nel caso dei rifiuti, nei locali autorizzati come deposito o in circoscritte aree del laboratorio in attesa del-

la rimozione. Il materiale radioattivo deve essere contenuto in recipienti sigillati in modo tale da prevenire versamenti, rotture accidentali, o il rilascio nell'aria. Se necessario il nuclide deve essere contenuto in recipienti sigillati al fine di prevenire radiazioni al personale che accede nelle aree di deposito.

I composti radioattivi contenenti sostanze cancerogene dovranno essere conservati separatamente da eventuali altri cancerogeni e debitamente etichettati come "**Sostanze carcinogene radioattive**".

Per entrambi i composti radioattivi cancerogeni e non, dovrà essere predisposto un elenco delle sostanze affisso direttamente sui frigoriferi con il segnale di pericolo di radioattività.

L'aerosol che deriva da materiale radioattivo non adeguatamente immagazzinato può causare contaminazioni delle aree adiacenti e del personale. Nell'operazione di scongelamento di materiale radioattivo che è stato conservato in freezer o in congelatore, può formarsi aerosol, è pertanto obbligatorio che tale materiale venga scongelato, aperto e utilizzato sotto cappa chimica o cappa per la sicurezza biologica o autorizzata anche per sostanze radioattive. Tutto il materiale radioattivo, quando viene immagazzinato, eliminato o utilizzato, deve essere etichettato con il simbolo di pericolo radioattivo, il tipo di isotopo, la data, la quantità di radioattività in DPM o microcuries, e deve riportare la frase "**Attenzione: sostanze radioattive**". Il luogo di stoccaggio verrà individuato dall'esperto qualificato sentito il medico autorizzato.

Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

Il danno dovuto all'irradiazione è causato principalmente dalla ionizzazione nei tessuti del corpo. Quando la radiazione interagisce con una cellula, vengono prodotte ionizzazioni ed eccitazioni nelle macromolecole biologiche o nel mezzo nel quale gli organelli cellulari sono sospesi, in modo predominante nell'acqua. A seconda del sito di interazione tra radioisotopi e cellule si possono distinguere interazioni dirette o indirette:

Interazione diretta avviene quando una particella ionizzante interagisce o è assorbita con le macromolecole della cellula (DNA, RNA, proteine, enzimi, ecc.). Queste macromolecole diventano strutture anormali che possono dare origine agli eventi che conducono ai

cambiamenti biologici.

Interazione indiretta implica l'assorbimento di radiazioni ionizzanti nel mezzo nel quale le molecole sono sospese. La molecola che più comunemente interpone questa azione è l'acqua. Attraverso un modo complesso di reazioni le molecole di acqua ionizzata formano radicali liberi che possono causare danno alle macromolecole.

Il più importante bersaglio per la radiazione nella cellula è il DNA nel nucleo. Gli effetti biologici risultano quando il danno al DNA non è riparato o è riparato in modo improprio. Un danno esteso al DNA può portare alla morte cellulare. Grandi numeri di cellule morenti possono portare al mal funzionamento degli organi e morte per l'individuo. Danno o riparazione impropria del DNA può sviluppare linfoma e cancro nelle cellule somatiche. Si possono verificare i seguenti effetti:

Effetti non random sono quelli per i quali una data esposizione produrrà, in un piccolo intervallo di variazione, lo stesso tipo di effetto. Nel caso di irradiazione globale a livelli di 1-2 grays (Gy), si ha una variazione nel numero di cellule del sangue (es. una diminuzione del livello di leucociti e piastrine e, un basso grado di eritrociti). Nel caso di irradiazioni locali della pelle, si osserva eritema a dosi tra 4 e 8 Gy, epidermidi secche a livelli eccedenti di 5 Gy, epidermidi essudative tra 12 e 20 Gy e necrosi dopo 25 Gy. Nel caso di irradiazione agli occhi, si osserva opacizzazione della lente del cristallino sopra 10 Gy di raggi X, o 0.8 Gy di neutroni e possono insorgere cataratte. Per irradiazione dei testicoli, 0.3 Gy porta a riduzione degli spermatozoi e sopra i 2 Gy la loro completa eliminazione, questi effetti sono reversibili; nel caso delle ovaie, dosi di irradiazioni di 12-15 Gy saranno causa irreversibile di sterilità in una donna di 25 anni, mentre solo 7 Gy produrrà lo stesso effetto in una donna di circa 40 anni.

Effetti random ricadono nell'incremento di rischio relativo di morte per cancro o l'evento di effetti di ereditarietà gravi nelle prime due generazioni dopo un'esposizione uniforme a tutto il corpo. Per questi effetti, si riconosce che la stessa dose può non produrre lo stesso effetto in persone diverse. La probabilità di rischio di sviluppare un cancro dopo irradiazione uniforme a tutto il corpo è stata espressa dalla Commissione Internazionale sulla Protezione Radiologica (1977, 1980) nella seguente formula,

$$\text{Numero di attesa di casi di cancro da irradiazione} = \text{Rischio calcolato per lo sviluppo di cancro} \times \text{Esposizione} \times \text{Dimensione della popolazione}$$

dove i rischi calcolati possono essere espressi per l'intero corpo, (a seconda del sesso, $1.65 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$ per femmina o $1.40 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$ per maschio) o per organi diversi la cui suscettibilità alla irradiazione è diversa (vedi Tabella 1). È da notare che è stato proposto il nuovo valore del rischio calcolato per le donne ($5 \times 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$) (Commissione Internazionale di Sicurezza Radiologica, 1990) che probabilmente verrà aumentato.

Come esempio, in una popolazione di 1200 donne che sono state

Tabella 1. Rischio random di danno in varie zone esposte

ORGANI ESPOSTI	RISCHIO RANDOM $\times 10^2 \text{ Sv}^{-1}$
Gonade	0.4
Midollo osseo	0.2
Polmone	0.2
Mammella	0.25
Tiroide	0.05
Osso	0.05

esposte a 50 nSv, si può attendere un caso di cancro o disordine genetico dovuto alle radiazioni.

Dagli elementi dell'elenco sopra, il maggior rischio è atteso con l'uso di ^{32}P .

Monitoraggio

Ogni spazio o area di laboratorio deve essere monitorato settimanalmente per il confinamento della radioattività. A tal scopo si dovrebbe nominare un responsabile per ogni area e tenere un registro del monitoraggio. Per isotopi come ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S e ^{14}C , può essere usato il monitor appropriato; per ^3H , il controllo dovrà essere effettuato mediante una garza inumidita con liquido di scintillazione sulle superfici e verificando con l'apposita strumentazione la contaminazione delle superfici stesse.

In particolare le aree da controllare includono:

- lavandini compresi i rubinetti, scarico e sifoni
- attrezzature varie
- attrezzature usate comunemente, es microcentrifughe, centrifughe da banco, strumentazioni per i gel
- i monitors stessi

Ogni area trovata contaminata dovrebbe essere pulita con adeguati detergenti e ricontrollata dopo questa operazione.

Procedure di emergenza

Nel caso della fuoriuscita di una grande quantità di radioisotopo (es. rottura di un intero contenitore o fiala), seguire questa procedura:

- Avvisare tutti gli operatori nell'immediata vicinanza che non sono contaminati e se possibile fare abbandonare l'area ed isolarla.
- Rimuovere qualunque abito contaminato il più rapidamente possibile e abbandonare il luogo dell'incidente.
- Informare l'ufficio della sicurezza radiologica.
- Trattare il personale contaminato (la cute dovrebbe essere lavata sotto l'acqua corrente e pulita delicatamente con una soluzione saponosa; qualunque ferita dovrebbe essere irrorata con abbondante acqua corrente). Usare apposito strumento per controllare la decontaminazione.
- Eseguire trattamento medico specialistico se ritenuto necessario dal Medico autorizzato.
- Decontaminare l'area interessata una volta che gli individui contaminati sono stati trattati.

Bibliografia

- California State University (http://riso.fullerton.edu/radiation_safety.htm)
- Castegnaro M., Brésil H., Manin J., P. Some safety procedures for handling ³²P during postlabelling assays. In: Phillips D.H., Castegnaro M., Bartsch H. Postlabelling methods for detection of DNA adducts. IARC scientific publications N° 124, IARC, Lyon, France. (1993).
- Duke University safety manual (<http://www.safety.duke.edu/SafetyManuals/>)

- International Commission on Radiological protection. Recommendation of the International Commission on Radiological Protection. Annals of ICPR, publication N° 26. (1977).
- International Commission on Radiological protection. Recommendation of the International Commission on Radiological Protection. Annals of ICPR, publication N° 30, part 2, volume 4. (1980).
- International Commission on Radiological protection Recommendation of the International Commission on Radiological Protection. Annals of ICPR, publication N° 60. (1990).

SCHEDE TECNICHE IDROGENO-3 [³H]

DATI FISICI

- **Energia Beta:** 18.6 keV (massima) 5.7 keV (media) (100% abbondanza).
- **Emivita fisica:** 12.3 anni.
- **Emivita biologica:** 10-12 giorni.
- **Emivita effettiva:** 10-12 giorni.
- **Attività:** 9640 Ci/gram.
- **Ampiezza massima Beta in Aria:** 6 mm.
- **Ampiezza massima Beta in Acqua:** 0.006 mm.
- **Penetrabilità nella sostanza o nel tessuto:** Insignificante [0% di energia di beta particella trasmessa attraverso lo strato morto della pelle].

DATI RADIOLOGICI

- La minima radiotossicità di tutti i radionuclidi.
- Organo critico: Acqua del Corpo o Tessuto.
- Vie di immissione: Ingestione, Inalazione, Puntura, Ferita, Contaminazione della pelle (Assorbimento) Debole l'energia di esposizione esterna essendo beta ³H - non si ha un processo radiologico.
- Esposizione interna e contaminazione sono processi radiologici primari.
- Committed Dose Equivalent (CDE): 64 mrem/mCi (ingerita), 64 mrem/mCi (inalata), 64 mrem/mCi (puntura).
- Committed Effective Dose Equivalent (CEDE): 90 mrem/mCi (ingerita), 63 mrem/mCi (inalata).
- Limite Annuale sull'immissione (ALI): 80 mCi (ingestione o inalazione) [3H₂O] [1.0 ALI = 80 mCi (³H) = 5,000 mrem CEDE].
- Percentuale di esposizione della pelle contaminata: 57,900 mrad/hr/mCi (contatto).
- Percentuale di esposizione unicamente per lo strato *corneo* della pelle.

- Contaminazione della pelle di $1.0 \mu\text{Ci}/\text{cm}^2 = 0 \text{ mrad}/\text{hr}$ dose percentuale alle cellule basali.
- Regola di Thumb: $0.001 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ di ^3H nel campione di urine è indicativo di una totale dose integrata in tutto il corpo 10 mrem approssimativamente (persona media) se non è stabilito il trattamento (es. lavare per mezzo di un forte getto con fluidi).

SCHERMI PROTETTIVI

- Non necessari.

ATTREZZATURA PER CONTROLLO CONTAMINAZIONI

- Non si può rilevare ^3H usando un G-M o un contatore di sorveglianza NaI.
- Il Contatore di liquido scintillante (indiretto) è il solo metodo di monitoraggio.

DOSIMETRIE PER IL MONITORAGGIO DELLA RADIAZIONE

- Non occorre dosimetro sul corpo o ad anello (beta energia è troppo bassa).

RIFIUTI RADIOATTIVI

- Solidi, liquidi, fiale descintillazione, materiale anatomico, carcasse di animali.

INFORMAZIONI DI CARATTERE NORMATIVO

- Concentrazione Aria Derivata (DAC): $2.0\text{E}-5 \mu\text{Ci}/\text{cc}$ (professionale).
- Limite Autorizzato di contaminazione aerea : $1.0\text{E}-7 \mu\text{Ci}/\text{cc}$. Se questa concentrazione fosse inalata continuamente per oltre un anno il risultato TEDE potrebbe essere 50 mrem .
- Limite di Superficie Controllata a seguito di decontaminazione: $2,200 \text{ dpm}/100 \text{ cm}^2$.
- Esame delle urine (Urynalysys Byproduct License): richiesto quando si manipola una quantità maggiore o uguale a $100 \text{ mCi } ^3\text{H}$.

INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA RADIOLOGICA GENERALE

- Volatilità relativa (a STP): Sostanziale.
- Le applicazioni sperimentali includono: i dati precisi dell'acqua

totale del corpo e la marcatura in-vivo delle cellule proliferative mediante iniezione di composti marcati con trizio (es. timidina).

- La marcatura con trizio è anche utilizzata in una varietà di studi metabolici.
- Ossidazione del gas ^3H in aria è di solito lenta.

CARBONIO-14 (^{14}C)

DATI FISICI

- **Energia Beta:** 156 keV (massima), 49 keV (media) (100% abbondanza).
- **Emivita Fisica:** 5730 anni.
- **Emivita Biologica:** 12 giorni.
- **Emivita Effettiva:** 12 giorni (Limite).
- **Emivita Effettiva:** 40 giorni (Non limite).
- **Emissione Attività Specifica:** 4460 mCi/gram.
- **Emissione Massima Beta in Aria:** 24.00 cm.
- **Emissione Massima Beta in Acqua/Tessuto:** 0.28 mm.
- **Emissione Massima in Plexiglas/Lucite/Plastica:** 0.25 mm.
- **Frazione di particelle beta di ^{14}C trasmesse attraverso lo strato morto della pelle:** alla profondità di 0.007 cm = 1%.

DATI RADIOLOGICI

- Organo Critico: Tessuto adiposo.
- Vie di penetrazione: Ingestione, Inalazione, Contatto cutaneo
- Esposizione esterna: dose da particelle beta deboli di ^{14}C non genera un processo radiologico.
- Esposizione interna e contaminazione: processi radiologici primari.
- Committed Dose Equivalent (CDE): 2.08 mrem/ μCi (ingestione) (Tessuto adiposo), 2.07 mrem/ μCi (puntura), 2.09 mrem/ μCi (inalazione).
- Committed Effective Dose Equivalent (CEDE): 1.54 mrem/ μCi (ingestione).
- Limite Annuale sull'Immissione (ALI): 2 mCi (ingestione di un composto organico marcato), 2000 mCi (inalazione monossido di carbonio marcato), 200 mCi (inalazione di biossido di carbonio marcato) [1.0 ALI = 2 mCi (ingestione del composto organico C-14) = 5,000 mrem CEDE].
- Percentuale di Dose di Contaminazione della pelle: 1090-1180

mrem per $1.0 \mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ ($7 \text{ mg}/\text{cm}^2$ profondità)

- Percentuale di Dose delle Cellule Basali della Pelle Contaminata: $1.0 \mu\text{Ci}/\text{cm}^2 = 1400 \text{ mrad}/\text{ora}$.
- Immersione nell'Aria Contaminata da $^{14}\text{C} = 2.183\text{E}7 \text{ mrem}/\text{anno}$ per $\mu\text{Ci}/\text{cm}^3$ alla profondità di $70 \mu\text{m}$ di tessuto e $4.07\text{E}6 \text{ mrem}/\text{anno}$ per $\mu\text{Ci}/\text{cm}^3$ valore medio sopra il derma.

SCHERMI PROTETTIVI

- Nessuna richiesta ($< 0.1 \text{ mm}$ plexiglas o vetro).

ATTREZZATURA DI INDAGINE

- Un contatore di indagine G-M con sportello sottile può individuare ^{14}C , ma la sonda del contatore deve essere di circa 1 cm . I contatori di indagine G-M hanno una bassa efficienza nel calcolare per ^{14}C (5%).
- Contrariamente, strofinando una garza inumidita con liquido di scintillazione sulle superfici, si può effettuare una lettura indiretta della radioattività residua da ^{14}C .

DOSIMETRIE PER IL MONITORAGGIO DELLA RADIAZIONE

- Non occorre (beta energia troppo bassa).
- Percentuale di Dose Beta ^{14}C : $6.32 \text{ rad}/\text{hr}$ a 1.0 nell'aria per $1.0 \text{ mCi } ^{14}\text{C}$.
- Percentuale di Dose di Contaminazione della pelle: $13.33 \text{ mrad}/\text{hr}$ per μCi sulla pelle.
- Percentuale di Dose da un 1 mCi isotopico punto di origine del ^{14}C : Distanza Rad/Hr 1.0 cm , 1241.4 ; 2.0 cm , 250.4 ; 15.2 cm , 0.126 ; 20.0 cm , 0.0046 .

INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA RADIOLOGICA GENERALE

- Analisi delle urine: Non Richiesto; comunque, usare prudenza dopo un versamento di ^{14}C radioattivo o un'emissione sospetta.
- Volatilità relativa (a STP): Non Significativa.
- Si deve prestare particolare attenzione a non generare lo sviluppo di gas $^{14}\text{CO}_2$ che potrebbe essere inalato.
- È possibile che solventi marcati ^{14}C vengano assorbiti attraverso

i guanti; cambiare frequentemente i guanti monouso e possibilmente lavorare con doppio strato di guanti.

- La Dose interna riguarda: contaminazione della pelle, ingestione, inalazione, e puntura.
- Indossare sempre un camice da laboratorio e i guanti monouso quando si lavora con ^{14}C .
- La concentrazione di carbonio nel tessuto adiposo e nel midollo giallo, è circa 3 volte la media della concentrazione di tutto l'organismo. Nessun altro organo o tessuto dell'organismo concentra carbonio stabile in modo così significativo. L'assorbimento frazionale di carbonio mediante la dieta (assorbito dal sangue) è sovente in eccesso di 0.90.
- Tre principali classi di composti di carbonio possono essere inalati: composti organici, gassosi (CO o CO_2), e aerosol di carbonio contenenti composti come carbonati e carburi.
- Composti Organici - la maggior parte dei composti organici non sono molto volatili in circostanze normali; la probabilità che questi possano essere inalati come vapori è pertanto bassa. Si devono comunque prendere le precauzioni necessarie, lavorare sotto cappa, usare Dispositivi di Protezione Individuale per impedire l'inalazione; se inalati, una volta entrate nel sistema respiratorio, sono immediatamente trasportate nel sistema circolatorio senza cambiare la loro forma chimica.
- Gas - l'inalazione di CO e la sua ritenzione nei tessuti dell'organismo è stata ampiamente studiata. Dal momento che il gas ha una bassa solubilità nell'acqua dei tessuti, dosi causate dal gas assorbito nei tessuti sono insignificanti in confronto con le dosi causate dalla ritenzione del legame CO all'emoglobina. CO_2 nel sangue esiste principalmente come un bicarbonato.
Carbonati e Carburi - Si assume che composti marcati con ^{14}C siano inalati o ingeriti sono immediatamente e uniformemente distribuiti attraverso tutti gli organi e tessuti del corpo dove essi sono trattenuti con una emivita biologica di 12-40 giorni.

FOSFORO-32 (³²P)

DATI FISICI

- **Energia Beta:** 1.709 MeV (massima), 0.690 MeV (media, 100% abbondanza).
- **Emivita fisica:** 14.3 giorni.
- **Emivita Biologica:** 1155 giorni.
- **Emivita Effettiva:** 14.1 giorni (osso) /13.5 giorni (tutto il corpo).
- **Emissione Specifica:** 285,000 Ci/gm.
- **Emissione Massima in aria:** 610 cm.
- **Emissione Massima Beta in Acqua/Tessuto:** 0.76 cm.
- **Emissione Massima in Plexiglass/Lucite/Plastica:** 0.61cm.

DATI RADIOLOGICI

- Organi critici (destinazione biologica) (forme solubili): Osso.
- Organi critici (forme insolubili o composti non-trasportabili di ³²P): Polmone (inalazione) e tratto Intestino crasso (ingestione).
- Vie di penetrazione: ingestione, inalazione, puntura, ferita, contaminazione della pelle (assorbimento) per esposizione sia esterna che interna a ³²P.
- Committed Dose Equivalent (CDE): 32 mrem/mCi D/midollo osseo).
- Committed Effective Dose Equivalent (CEDE): 7.50 mrem/mCi (ingerito/WB) 5.55 mrem/mCi (inalato/Classe D), 13.22 mrem/mCi (inalato/Classe W).
- Percentuale di Dose di Contaminazione della pelle: 8700-9170 mrem/mCi/cm² (7 mg/cm² o 0.007 cm profondità nel tessuto).
- Percentuale di Dose delle Cellule Basali della Pelle Contaminata: 1.0 mCi/cm² (dose locale) = 9200 mrad/hr.
- L'osso riceve approssimativamente il 20% della dose ingerita o inalata per composti solubili di ³²P.
- I tessuti con rapide percentuali di turnover cellulare evidenziano un'alta ritenzione dovuta alla concentrazione di fosforo nelle nucleoproteine.

- ^{32}P è eliminato dall'organismo fondamentalmente per via urinaria.
- Metabolismo Fosforo: vedi la scheda del ^{33}P .

STRUMENTO DI INDAGINE

- Il contatore di indagine GM e una sonda apposita.
- La sonda di NaI a bassa energia è usata solo per determinare “*Bremsstrahlung x-rays*”.
- Il contatore del liquido di scintillazione (conta indiretta) può essere usato per individuare la contaminazione rimovibile della superficie contaminata di ^{32}P su macchie o superfici già pulite.

PERCENTUALI DI DOSI (FROM UNSHIELDED 1.0 mCi ISOTROPIC POINT SOURCE)

- Distanza Rads/hr; 1.00 cm 348; 15.24 cm 1.49; 10.00 ft 0.0015
780,000 mrad/hr alla superficie di 1.0 mCi ^{32}P in 1 ml liquido.
26,000 mrad/hr all'apertura della fiala contenente 1.0 ml ^{32}P in 1.0 ml liquido.

SCHERMI PROTETTIVI

- Plexiglass/acrilico/lucite/plastica/legno spessi 8 mm.
- Non usare una lamina metallica di piombo o lamiera perchè penetrando sarà prodotto “*Bremsstrahlung x-ray*”.
- Usare lamiera di piombo o lamina metallica per proteggere “*Bremsstrahlung x-rays*” solo dopo uno schermo a bassa densità di plexiglas/acrilico/lucite/legno.

PRECAUZIONI GENERALI

- Poiché si fissa alle ossa, speciali precauzioni devono essere prese per minimizzare ogni effetto dovuto all'introduzione nell'organismo.
- La contaminazione per via aerea può avvenire mediante essiccamento (polvere), rapida ebollizione, o soluzioni espulse attraverso aghi di siringhe e puntali di pipette (aerosol).
- I monitoraggi del personale (dosimetro per il corpo e anelli dosimetrici) sono richiesti quando si manipola ^{32}P in quantitativi superiori a 1.0 mCi.

- Mai lavorare direttamente sopra un contenitore aperto; evitare l'esposizione diretta degli occhi a particelle penetranti di ^{32}P beta emittente.
- Indossare sempre un camice da laboratorio e i guanti monouso quando si manipola ^{32}P .
- Monitorare le aree di lavoro del personale e i pavimenti usando un contatore di indagine GM dotato di una sonda specifica (beta) per la contaminazione di superfici.
- Monitorare la superficie dove il ^{32}P è stato usato e rimuovere l'eventuale contaminazione.
- Usare schermi protettivi a bassa densità (numero atomico basso) per schermarsi da ^{32}P e ridurre la formazione di raggi x "*Bremsstrahlung*". I seguenti materiali hanno basso numero atomico: plexiglass, acrilico, lucite, plastica, legno o acqua.
- Non usare lamina metallica di piombo, lamiere di piombo, o altro materiale ad alta densità (metalli) per schermarsi direttamente da ^{32}P . Materiale con numero atomico più alto di quello dell'alluminio ($Z = 13$) non dovrebbe essere usato. Vengono generati Raggi x "*Bremsstrahlung*" da piombo e da altri materiali di protezione ad alta densità. Occhiali di sicurezza o schermi protettivi facciali sono consigliati quando si lavora con ^{32}P .
- L'efficienza del tipico contatore GM di indagine con sonda specifica è maggiore o uguale al 45%. L'efficienza calcolata dal tipico contatore a liquido di scintillazione per ^{32}P (finestra piena/massima) è maggiore o uguale a 85%.
- Il limite tipico di rilevazione di ^{32}P nei campioni di urina usando un contatore a liquido di scintillazione è $1.1 \times 10^{-7} \text{uCi/ml}$.

FOSFORO-33 (³³P)

DATI FISICI

- **Energia Beta:** 0.249 MeV (massima, 100% abbondanza), 0.085 MeV (media).
- **Emivita Fisica:** 25.4 giorni.
- **Emivita Biologica:** 19 giorni (40% di immissione, 30% rapidamente eliminata dall'organismo, il rimanente 30% decade).
- **Emivita Effettiva:** 24.9 giorni (osso).
- **Specifica attività:** 1,000 - 3,000 Ci/millimole.
- **Emissione Massima Beta in aria:** 89 cm = 35 pollici = 3 piedi.
- **Emissione Massima Beta in Acqua/Tessuto:** 0.11 cm = 0.04 pollice.
- **Emissione Massima in Plexiglas/Lucite/Plastica:** 0.089 cm = 0.035 pollice.
- **Half-Value Layer (HVL):** 0.30 mm (acqua/tessuto).

DATI RADIOLOGICI

- Organo critico (destinazione biologica) (forme solubili): Midollo osseo.
- Organi critici (forme insolubili o composti non-trasportabili ³³P): polmone (inalazione) e intestino (ingestione).
- Vie di immissione: ingestione, inalazione, puntura, ferita, contaminazione cutanea (assorbimento).
- Esposizione interna e contaminazione sono i principali fattori radiologici.
- Committed Dose Equivalent (CDE): 0.5 mrem/mCi (inalazione).
- Percentuale di Dose di Contaminazione della pelle: 2,910 mrem/hr/ μ Ci/cm² (7 mg/cm² o 0.007 cm profondità nel tessuto).
- La frazione di particelle ³³P beta trasmesse mediante lo strato morto della pelle è circa il 14%.
- I tessuti con rapide percentuali di ricambio cellulare evidenziano un'alta ritenzione dovuta alla concentrazione di fosforo nelle nucleoproteine.
- ³³P è eliminato dall'organismo principalmente per via urinaria.

- Metabolismo del Fosforo:
 - 30% è rapidamente eliminato dall'organismo.
 - 40% ha una emivita biologica di 19 giorni.
 - 60% di ^{33}P (ingerito) escreto dall'organismo nelle prime 24 ore.

PROTEZIONE

- Non richiesta, comunque è consigliato materiale a bassa densità, es. plexiglass spesso 3/8 pollici, acrilico, lucite, plastica o compensato.

STRUMENTO DI INDAGINE

- Contatore GM di indagine con sonda specifica.
- Contatore a liquido di scintillazione: può essere usato per individuare la contaminazione rimovibile dalla superficie.

DOSIMETRI PERSONALI

- Non richiesti, poiché non rilevano questo nuclide di bassa energia.

PRECAUZIONI GENERALI

- Volatilità inerente (STP): Insignificante.
- Proteggere la cute da possibili contaminazioni (guanti camice).
- L'essiccazione può portare a contaminazione aerogena di ^{33}P mediante la formazione di polveri.
- Monitorare le zone di lavoro a seguito di contaminazioni mediante "wipe-test" (strofinare usando una garza imbevuta con liquido di scintillazione e leggere eventuali emissioni residue).

ZOLFO-35 (³⁵S)

DATI FISICI

- **Energia Beta:** 167 keV (massima) 53 keV (media) (100% abbondanza).
- **Emivita Fisica:** 87.4 giorni.
- **Emivita Biologica:** 623 giorni (³⁵S libero).
- **Emivita Effettiva:** 44-76 giorni (³⁵S libero).
- **Attività Specifica:** 42,400 Ci/g.
- **Emissione Massima Beta in aria:** 26.00 cm = 10.2 in.
- **Emissione Massima Beta in Acqua/Tessuto:** 0.32 mm. = 0.015 in.
- **Emissione Massima Beta in plexiglass o Lucite:** 0.25 mm. = 0.01 in.
- **Frazione di ³⁵S beta trasmesso attraverso lo strato morto della pelle = 12%.**

DATI RADIOLOGICI

- Organo Critico: Testicolo.
- Vie di immissione: ingestione, inalazione, puntura, ferita, contaminazione della pelle (assorbimento).
- Esposizione esterna (dose profonda) alle particelle deboli ³⁵S beta non è un fattore radiologico.
- Esposizione interna e contaminazione sono i principali fattori radiologici.
- Committed dose equivalent (CDE): 10.00 mrem/μCi (ingerita), 0.352 mrem/μCi (puntura).
- Committed Effective Dose Equivalent (CEDE): 2.6 mrem 1/μCi (ingerita) (Suppone una emivita biologica di 90 giorni).
- Limite Annuale sull'immissione (ALI)*: 10 mCi (ingerimento di composti inorganici di ³⁵S); 6 mCi (ingerimento di ³⁵S elementare); 8 mCi (ingerimento di solfuri o solfati/LLI)**; 10 mCi (inalazione di vapori di ³⁵S); 20 mCi (inalazione di solfuri o solfati); 2 mCi (inalazione di ³⁵S elementare).

* 1.0 ALI = 10 mCi (vapori di ³⁵S inalati) = 5,000 mrem CEDE.

** 1.0 ALI = 8 mCi (ingerimento solfuri/solfati LLI) = 50,000 mrem CDE.

- Percentuale di Dose di Contaminazione della pelle: 1,170 - 1,260 mrem/1.0 $\mu\text{Ci}/\text{cm}^2$ (profondità 7.0 mg/cm^2).
- Percentuali di Dose Beta per ^{35}S : 14.94 rad/h (contatto) in aria per 1.0 mCi, 0.20 rad/h (6 pollici) in aria per 1.0 mCi.

SCHERMI PROTETTIVI

- Non richiesti (la protezione di 1 cm di plexiglass fermerà completamente le radiazioni; la protezione di 0,3 mm di plexiglass e 0.2 mm di vetro sono adeguate ma non hanno le stesse proprietà meccaniche).

STRUMENTO DI INDAGINE

- Il contatore di indagine GM ha bassa efficienza, di solito 4-6%.
- Il contatore a liquido di scintillazione (per strofinare, per ungerre) può essere usato secondariamente, ma non scoprirà la contaminazione non rimovibile!

DISPOSITIVI PER MONITORARE LE RADIAZIONI

- Dosimetro: non necessario perché l'energia ^{35}S beta è troppo bassa e non è un pericolo di radiazioni esterne.
- Percentuale di Dose da una fonte del punto isotropico non protetto di 1 mCi di ^{35}S : Distanza rad/Hr 1.0 cm, 1173.6 ; 2.5 cm, 93.7 ; 15.24 cm, 0.2 and 20.00, cm 0.01.

INFORMAZIONI GENERALI SULLE RADIAZIONI

- Esame urine: non richiesto, ma può essere richiesto dallo staff dei medici autorizzati dopo un versamento o una contaminazione del personale con ^{35}S .
- Volatilità (STP): Significativa per metionina ^{35}S e cisteina ^{35}S .
- La Radiolisi degli amminoacidi (cisteina e metionina) ^{35}S durante la conservazione e l'utilizzo può portare al rilascio di impurità volatili. Le impurità volatili sono insignificanti.
- Il comportamento metabolico dei composti organici di zolfo (cisteina e metionina) differisce considerevolmente dal comportamento metabolico dei composti inorganici.
- I composti organici dello zolfo (cisteina e metionina) vengono

incorporati in vari metaboliti. Infatti quando lo zolfo entra nell'organismo come composto organico viene fissato.

- L'assorbimento frazionale di zolfo dal tratto gastrointestinale è normalmente > 60% per i composti organici di zolfo. Lo zolfo nella forma elementare è molto meno assorbito dal tratto GI rispetto ai composti inorganici (80% per tutti i composti inorganici e 10% per lo zolfo nella sua forma elementare).
- Lo zolfo elementare è trattenuto dall'organismo per settimane. Lo zolfo entra nei polmoni in forma di gas (SO_2 , COS, H_2S e CS_2) ed il suo metabolismo è lo stesso di ogni altro composto organico in cui sia presente lo zolfo.
- Si può presentare contaminazione di contenitori e di superfici interne in zone per la conservazione.
- Le fiale di cisteina e metionina marcate con ^{35}S dovrebbero essere aperte e usate sotto cappa chimica autorizzata.
- I composti volatili di amminoacidi marcati con ^{35}S dovrebbero essere aperti e usati sotto cappa chimica autorizzata.
- I composti volatili di cisteina e metionina marcate con ^{35}S si ritiene che siano rispettivamente solfuro di idrogeno (H_2S) e mercaptano metilico (CH_3SH), rispettivamente.
- Vapori di ^{35}S possono essere rilasciati quando si aprono fiale contenenti amminoacidi marcati, durante l'incubazione di colture o cellule contenenti ^{35}S e la conservazione di rifiuti contaminati di ^{35}S .
- Si può verificare una contaminazione eccessiva sulle superfici interne e nelle riserve di acqua di incubatori utilizzati con materiale marcato con ^{35}S o sulle guarnizioni di gomma di incubatori e centrifughe.
- Durante i processi di congelamento si può avere rottura di fiale marcate, con rilascio anche di $1.0 \mu\text{Ci}$ di ^{35}S per 8.0 mCi di fiala di amminoacido marcato con ^{35}S durante il processo di scongelamento.
- Il lavoro con amminoacidi marcati con ^{35}S dovrebbe essere condotto in una cappa aspirante destinata per lavorare con radioisotopi.
- Durante l'apertura delle fiale contenenti amminoacidi marcati

sarebbe utile farle sfiatare assorbendo il vapore con una siringa monouso dotata di uno strato di carbone attivo con un'alta affinità per i vapori di ^{35}S .

- Al fine di decontaminare gli incubatori in cui vi sia stata fuoriuscita di radioisotopi è bene predisporre una piastra o un contenitore con carbone in polvere omogeneamente distribuito; questo, per assorbimento passivo, garantirà la decontaminazione. Il carbone a sua volta dovrà essere smaltito come prodotto radioattivo solido.

IODIO-125 [¹²⁵I]

DATI FISICI

- **Energie Gamma:** 35.5 keV (7% abbondanza/93% internamente gamma convertita) (Non emette beta), 27.0 keV (113%, x-raggi), 27-32 keV (14%, x-raggi) 31.0 keV (26%, x-raggi).
- **Costante Specifica dei Raggi Gamma:** da 0.27 a 0.70 mR/hr per mCi a 1 contatore (letteratura corrente indica 0.27 mR/hr per mCi a 1 contatore).
- **Emivita Fisica:** 60.1 giorni.
- **Emivita Biologica:** 120-138 giorni (iodio libero)-eliminato dalla tiroide.
- **Emivita Effettiva:** 42 giorni (iodio libero)-ghiandola della tiroide.
- **Attività Specifica:** 17,400 Ci/gm (teorica/carrier libero).
- **Attività Specifica Intrinseca:** 22.0 Ci/millimole.

DATI RADIOLOGICI

- Organo Critico (Destinazione Biologica): Tiroide.
- Vie di immissione: ingestione, inalazione (molto probabile), puntura, ferita, contaminazione della pelle (assorbimento).
- Vi può essere esposizione e contaminazione esterna ed interna con l'utilizzo di ¹²⁵I.
- Committed Dose Equivalent (CDE): 814 mrem/mCi (tiroide/inalazione/classe "D") (Dosi Organo), 1185 mrem/mCi (tiroide/ingestione/forma NaI), 910 mrem/mCi (tiroide/inalazione), 1258 mrem/mCi (ogni organo/puntura/adulto).
- Committed Effective Dose Equivalent (CEDE): 24 mrem/mCi (tutto l'organismo/inalazione).

PROTEZIONE

- Lamina di piombo (1/32 a 1/16 inch thick): 0.152 mm lamina di piombo.
- Strato di Valore medio: 0.02 mm - 0.008 pollici.

STRUMENTI DI INDAGINE

- Il contatore di indagine provvisto di una sonda a bassa energia di scintillazione NaI è necessario.
- I contatori di indagine provvisti di dispositivi GM o sonde con finestra finale GM sono inefficienti. Queste sonde non sono usate per monitorare la contaminazione; esse sono efficienti solo circa allo 0.1%.

DOSI PERCENTUALI

- (dalla sorgente non protetta del punto isotropico 1.0 mCi) Distanza mrads/hr 1.00 cm 156 - 275; 10.00 cm 15.5 - 27.5 100.00 cm 0.156 - 0.28 6.00 in 6.5 (Qualche autore indica 0.7 mrad/hr per mCi a 100 cm.)
- I lavoratori che useranno ^{125}I nella forma chimica NaI o KI dovranno essere sottoposti a esame della tiroide per avere un riferimento iniziale rispetto all'esposizione futura.
- La ghiandola della tiroide accumula 20 - 30% dello iodio radioattivo solubile preso dall'organismo. Tutto lo iodio radioattivo assunto dall'organismo potrà essere eliminato completamente per via urinaria.
- È richiesto dalla legge un esame biologico della tiroide quando si manipola un quantitativo uguale o superiore a 1 mCi nella forma chimica di NaI o KI. Il Limite soglia in base al principio ALARA è considerato 0.1 mCi. L'esame della tiroide post esposizione dovrà essere fatto almeno 24 ore dopo e comunque entro una settimana dopo l'esposizione a ^{125}I . Inoltre, tutti gli operatori che assistono o effettuano delle sperimentazioni con i quantitativi indicati o che lavorano nella stessa stanza (entro alcuni metri), in modo da essere comunque esposti a ^{125}I , devono essere sottoposti agli esami sopra citati. Il vetro scorrevole della cappa fornisce protezione adeguata per sperimentazioni con iodio. Non sono consigliate ulteriori protezioni poiché potrebbero ostacolare il flusso dell'aria all'interno della cappa.
- È consigliato usare un ago cannula per aprire le fiale contenenti ^{125}I . Questo impedisce la formazione di spruzzi.
- È bene dividere i rifiuti con iodurazione libera o legata. I rifiuti

ermeticamente chiusi verranno momentaneamente immagazzinati sotto cappa o armadi aspiranti; comunque dovranno essere sempre conservati o in sacchetti sigillabili o, in caso di liquidi, in contenitori a chiusura ermetica.

- Le provette per iodurazioni oltre ad essere chiuse dovranno essere avvolte da una pellicola di parafilm in modo da impedire il rilascio accidentale durante le operazioni di conta o nelle fasi di agitazione fuori dalla cappa aspirante.

LA SORVEGLIANZA DEI LAVORATORI

*Bruno Papaleo, Stefano Signorini, Nicoletta Vonesch,
Cinzia Lucia Ursini, Paola Tomao*

Introduzione

La sorveglianza sanitaria dei lavoratori è un termine generico che include procedure ed indagini per valutare la salute dei lavoratori, al fine di scoprire ed identificare precocemente qualunque anormalità. I risultati della sorveglianza devono essere usati per tutelare e promuovere la salute di tutti i lavoratori e di altre persone nei luoghi di lavoro. Le procedure di valutazione della salute possono includere – ma non sono limitate a – esami medici, monitoraggio biologico, esami radiologici, questionari o dati sanitari.

La sorveglianza sanitaria dei lavoratori deve essere una componente essenziale dei programmi mirati alla protezione dei lavoratori e tali programmi devono stabilire gli esami medici previsti dalla legge. Un sistema completo di sorveglianza sanitaria dei lavoratori include valutazioni individuali e collettive, danni professionali, protocolli e denunce delle malattie, denunce di casi sentinella, perizie, indagini ed esami.

Principi della sorveglianza sanitaria

Obiettivi e organizzazione

La sorveglianza sanitaria viene considerata come uno strumento finalizzato al mantenimento della salute del lavoratore e alla sua protezione anche attraverso la valutazione dell'esposizione e degli eventuali effetti biologici precoci.

La valutazione della salute del lavoratore è una delle componenti principali di qualunque programma di prevenzione nel luogo di lavoro. Gli esami medici sono i metodi più comuni di valutazione della salute dei singoli lavoratori.

Esami medici e consultazioni, o come parte dei programmi di protezione o sulla base delle necessità che si presentano, rispondono a

cinque scopi principali:

- Valutazione della validità delle misure di controllo nel luogo di lavoro.
- Individuazione di anomalie pre-cliniche e cliniche in un momento nel quale l'intervento sia benefico per la salute del singolo individuo.
- Prevenzione di un ulteriore peggioramento della salute del lavoratore.
- Rafforzamento di metodi di lavoro sicuro e di metodi di mantenimento della salute.
- Valutazione dell'idoneità ad un particolare tipo di lavoro; si auspica attualmente l'adattamento al luogo di lavoro per il lavoratore.

La sorveglianza sanitaria, universalmente considerata come una composita attività di prevenzione secondaria, si basa sul controllo sanitario periodico dei lavoratori con l'obiettivo di proteggere la loro salute e prevenire le malattie correlate al lavoro. Mira ad identificare precocemente, possibilmente quando sono ancora in fase subclinica, le alterazioni dello stato di salute mediante lo studio della funzionalità degli organi e apparati che possono essere alterati a causa dei fattori di rischio presenti negli ambienti di lavoro. Inoltre essa è rivolta a evidenziare quelle alterazioni delle condizioni di salute che, pur non essendo conseguenti all'esposizione, possono essere aggravate dalla specifica attività lavorativa o comunque possono interagire con il normale svolgimento della stessa.

La sorveglianza sanitaria deve costituire parte integrante di un più ampio programma di promozione della salute occupazionale che, in particolare, prevede l'identificazione dei fattori di rischio e la conoscenza delle modalità di esposizione. La valutazione del rischio è il presupposto indispensabile per una corretta programmazione degli accertamenti sanitari, come viene peraltro sottolineato dalle direttive comunitarie in materia.

È obiettivo della sorveglianza sanitaria (Tab.I) la protezione della salute e prevenzione della malattia lavorativa in una accezione ampia che comprenda la prevenzione del danno, ma anche la prevenzione del

malessere e, ove attuata con strumenti adeguati, possa fornire una previsione del benessere. L'obiettivo viene raggiunto qualora il lavoratore sia assegnato a una mansione confacente alle proprie capacità senza pregiudizio per la salute propria e altrui attraverso:

- la determinazione di una generica idoneità al lavoro, tenendo in considerazione anche i possibili cambiamenti di mansione
- la valutazione di eventuali condizioni che possano costituire controindicazioni a mansioni che comportino rischi particolari;
- la valutazione di eventuali condizioni suscettibili di futuro aggravamento in seguito all'espletamento della mansione assegnata
- la definizione di un quadro iniziale per avere un confronto con le condizioni future

Tabella I - Propositi e principi generali della sorveglianza sanitaria

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• La sorveglianza sanitaria appartiene alla disciplina della salute e sicurezza occupazionale.• Il proposito centrale è la prevenzione primaria degli infortuni e delle malattie professionali e lavoro - correlate.• Deve essere correlata ai rischi specifici dell'attività svolta dal lavoratore.• Deve essere periodicamente rivalutata nelle sue procedure e non deve essere intesa come mera attività di routine.• Si svolge preferibilmente all'interno di servizi di salute occupazionale, organizzati secondo la convenzione n.171 (riguardanti appunto i servizi di salute occupazionale) adottate dall'ILO nel 1985. |
|---|

La sorveglianza sanitaria viene attuata a seguito del processo di valutazione dei rischi. Premesso che prima dell'assunzione deve essere effettuato l'accertamento preventivo per la formulazione del giudizio di idoneità alla mansione specifica e che, a prescindere dalle successive valutazioni dei rischi, già all'atto di tale visita potrà emergere la necessità di effettuare visite successive dello stato di salute, gli operatori devono essere controllati periodicamente sulla base della valutazione dei rischi (Tab. II). La modificazione dei rischi lavorativi presenti nei laboratori può influenzare il programma di sorveglianza sanitaria (periodicità delle visite mediche, tipo di accertamenti clinici, indicazione a vaccinazioni, ecc.).

Tabella II - Organizzazione della sorveglianza sanitaria

- Visite mediche per l'accertamento dello stato di salute dei lavoratori.
- Test biologici ed altri accertamenti medici.
- Sistemi di notifica e di registrazione dei dati.
- Ricerca epidemiologica.
- Sopralluoghi nei luoghi di lavoro.

Rispetto alle visite mediche ed ai test clinici, gli strumenti attualmente a disposizione del medico del lavoro per tutelare la salute del lavoratore sono:

- Accertamento preventivo da effettuare prima dell'assunzione (accertamento preventivo preassuntivo).
- Accertamento preventivo da effettuare prima del cambiamento di mansione (accertamento preventivo per cambio mansione).
- Accertamento preventivo da effettuare a cadenza definita dopo l'assunzione (accertamento preventivo periodico).
- Accertamento di fine rapporto.

Si sottolinea che la raccolta, l'elaborazione e la comunicazione dei dati sanitari deve avvenire nel rispetto della confidenzialità dei risultati e della protezione dei dati personali. L'uso dei dati sanitari è finalizzato alla protezione della salute e l'idoneità lavorativa viene definita solo in relazione al lavoro specifico.

Contenuti della sorveglianza sanitaria dei lavoratori

Il medico addetto alla sorveglianza sanitaria, per la valutazione dell'idoneità di lavoratori esposti a vari fattori di rischio, in occasione delle visite mediche preventive e successivamente delle visite periodiche ed eventualmente straordinarie, si basa sui principi che disciplinano la medicina del lavoro, provvedendo in particolare alla verifica dell'effettiva compatibilità tra le condizioni psicofisiche del lavoratore e gli specifici rischi individuali connessi alla sua destinazione lavorativa ed alle sue mansioni.

In funzione delle differenti tipologie di rischio, il medico addetto alla sorveglianza sanitaria considera con particolare attenzione, ai fini della valutazione dell'idoneità alla mansione specifica, le seguenti condizioni fisiopatologiche:

- Condizioni suscettibili di essere attivate o aggravate dall'esposizione allo specifico fattore di rischio.
- Condizioni suscettibili di aumentare l'assorbimento di agenti chimici, fisici o biologici o di ridurre l'efficacia dei meccanismi fisiologici di depurazione e/o escrezione.
- Condizioni suscettibili di essere confuse con patologie derivanti dall'esposizione a fattori chimici, fisici o biologici o attribuite all'azione lesiva di tali fattori.

In relazione alla natura e all'entità del rischio, ed alle caratteristiche dell'attività lavorativa, dovranno inoltre essere considerate le condizioni psicofisiche suscettibili di porre problemi in ordine alle condizioni di sicurezza del lavoro, nonché l'eventuale esistenza di anomalie e/o di condizioni patologiche che possano limitare l'utilizzazione di dispositivi di protezione individuale.

Durante gli esami e le consultazioni mediche, il medico addetto alla sorveglianza sanitaria:

- Informa i lavoratori dei potenziali danni o malattie e delle misure necessarie per prevenirle.
- Informa i lavoratori delle potenziali malattie e delle condizioni di lavoro o di esposizione che possono essere controindicate da un punto di vista medico, e dei luoghi nei quali possono ottenere indicazioni per terapie o correggere le proprie condizioni.
- Informa i lavoratori e i loro datori di lavoro dell'efficacia o meno delle misure di controllo.
- Collabora con il datore di lavoro per collocare i lavoratori in occupazioni che tengano conto delle loro capacità per un particolare lavoro.
- Forma i giovani a fare attenzione alle proprie attitudini fisiche e mentali, allo scopo di agevolare un'appropriata guida professionale.
- Previene la totale esclusione di ogni lavoratore dall'impiego, e provvede all'impiego di tutti i lavoratori, nonostante alcune controindicazioni, nel lavoro nel quale lui/lei sia competente, tenendo in considerazione le opportunità di impiego disponibili.

Gli esami medici e i test non devono essere eseguiti superficialmen-

te ma è importante considerare il loro valore e la loro importanza. Devono essere utilizzati mediante una serie di norme che includano:

- selezionare test appropriati che siano accettabili per i lavoratori
- eliminare i test che non rispondono alle esigenze per pertinenza, specificità e sensibilità
- rivedere periodicamente i programmi di sorveglianza sanitaria e modificarli alla luce delle migliori condizioni di lavoro

Le procedure per gli esami medici includono la storia personale ed esami clinici. Possono includere questionari, test diagnostici, misurazioni delle funzioni e test biologici dei livelli di esposizione ad agenti ambientali nel luogo di lavoro. Questi esami sono rilevanti per individuare la natura del rischio. I medici addetti alla sorveglianza sanitaria o i medici generici impegnati nell'esercizio della sorveglianza sanitaria devono conservare una responsabilità totale per i test biologici, per gli altri esami medici, e per l'interpretazione dei risultati, sebbene i test possano essere fatti da infermieri, tecnici e altro personale preparato sotto la loro supervisione.

Gli esami medici devono essere eseguiti, dove necessario, prima o poco dopo il lavoro o l'incarico, per raccogliere informazioni per la sorveglianza sanitaria futura.

Gli esami medici possono essere pianificati in intervalli periodici durante il lavoro e devono essere appropriati ai rischi occupazionali dell'impresa. Questi esami possono anche essere effettuati: (1) alla ripresa del lavoro dopo un'assenza prolungata per ragioni di salute con lo scopo di evidenziare eventuali possibili cause occupazionali, raccomandare azioni appropriate per proteggere i lavoratori e determinare l'idoneità per il lavoro o la necessità di riassegnazione e riabilitazione; (2) a richiesta del lavoratore, per esempio, quando lui/lei cambia lavoro e, in particolare, quando un lavoratore cambia lavoro per ragioni mediche.

In alcuni casi al medico addetto alla sorveglianza sanitaria può essere richiesto di eseguire un esame medico ai lavoratori dopo la cessazione dei loro lavori o incarichi per stabilire le condizioni di salute e, considerando le informazioni fornite dagli esami periodici precedenti, per valutare gli effetti del lavoro assegnato sulla salute del lavoratore. Potrebbe essere necessario effettuare la sorveglianza sanitaria anche al termine del

lavoro per persone che sono state esposte ad agenti con effetti a lungo termine, con lo scopo di garantire una diagnosi precoce e un trattamento di malattie quali cancro alla cute, ai polmoni e alla vescica.

Gli esami medici devono servire per prevenire e proteggere non solo la salute dei lavoratori ma anche a proteggere l'accesso al lavoro, garantire un risarcimento e benefici di assicurazione della salute e di protezione sociale. In nessuna circostanza gli esami medici devono essere utilizzati per sostituire le misure di prevenzione e controllo dei rischi di esposizione, ma devono essere usati per migliorare le condizioni di lavoro in modo tale da facilitare l'adattamento del lavoratore al lavoro.

I risultati degli esami periodici, insieme alle informazioni sui livelli di esposizione ambientale, possono essere usati per verificare il livello di protezione fornito dai limiti di esposizione e per contribuire alla loro revisione. Inoltre tali esami potrebbero essere usati frequentemente per identificare i possibili effetti sanitari della variazione dei metodi di lavoro, dell'organizzazione del lavoro, delle condizioni di lavoro, delle nuove tecnologie, o dei processi lavorativi o dei nuovi prodotti.

Nel caso di esposizione a specifici rischi occupazionali, in aggiunta agli accertamenti sanitari descritti sopra, la sorveglianza sanitaria dei lavoratori deve includere, dove appropriato, alcuni esami che potrebbero essere necessari per scoprire i livelli di esposizione, i primi effetti biologici e le reazioni.

Quando esiste un metodo di monitoraggio biologico della salute dei lavoratori valido e generalmente accettato, per diagnosi precoci degli effetti sulla salute dell'esposizione a specifici rischi occupazionali, questo può essere usato per identificare i lavoratori che necessitano di approfondimenti diagnostici.

Test biologici ed altri esami

Esistono test biologici e altri esami specifici per scoprire il prima possibile alcuni disturbi organici o esposizioni potenzialmente dannose, che sono validi e ampiamente usati. In molti casi sono parte integrante degli esami medici. Nella maggior parte dei casi questi esami sono parte integrante degli esami medici e necessitano del consenso informato del lavoratore; inoltre devono essere condotte in base agli standard professionali migliori con il minimo rischio possibile.

I test biologici e gli altri esami medici devono essere eseguiti sotto la supervisione di un medico e sono soggetti a riservatezza medica; devono essere relativi alla protezione della salute del lavoratore, con debito riguardo alla loro sensibilità, specificità e valore predittivo.

Quando è possibile e appropriato scegliere devono sempre essere adottati metodi non invasivi ed esami che non mettano in alcun pericolo la salute del lavoratore.

Un esame invasivo o che comporti un rischio per la salute del lavoratore può essere suggerito solo dopo una valutazione dei benefici per il lavoratore e dei rischi conseguenti e non può essere giustificato in relazione ad una richiesta di assicurazione. I test di monitoraggio biologico che sono semplici ed hanno raggiunto livelli di massima efficacia, sono particolarmente utili per la sorveglianza sanitaria dei lavoratori quando opportunamente usati, e sono efficaci quando utilizzati per il monitoraggio individuale e collettivo dei lavoratori esposti. Tuttavia essi non devono sostituire la sorveglianza dell'ambiente di lavoro e la valutazione delle esposizioni individuali.

Precedenza assoluta deve essere data ai criteri ambientali (limiti di esposizione) su quelli biologici (esposizione biologica e limiti).

I valori trovati comunemente nella collettività devono essere presi in considerazione per valutare i risultati del monitoraggio biologico.

La sorveglianza sanitaria dei lavoratori può essere prescritta dalla legge (Tab. III) oppure no e può essere obbligatoria o volontaria.

Tabella III - Direttive principali relative alla sorveglianza sanitaria dei lavoratori

NUMERO	SOGGETTO	ARTICOLO
89/391	Sicurezza occupazionale e miglioramento della salute	art. 14
90/394	Rischio cancerogeno	art. 14 (all. II)
90/679	Rischio biologico	art. 14
97/42	Rischio cancerogeno	
90/394	Rischio cancerogeno modificato per la 1° volta	art. 14 (all. II)
98/24	Agenti chimici	art. 10
99/38	Rischio cancerogeno	
90/394	Rischio cancerogeno modificato per la 2° volta	art. 14 (all. II)

Sorveglianza sanitaria nella ricerca biotecnologica

I rischi potenziali in un laboratorio o industria biotecnologica includono esposizione ad agenti biologici (compresi microrganismi ricombinanti e non-ricombinanti), agenti chimici e una molteplicità di rischi fisici.

Rischi biologici

Numerosi sono gli agenti biologici con i quali i ricercatori nel settore delle biotecnologie possono entrare in contatto; i processi lavorativi, infatti, impongono, spesso, l'utilizzo o l'esposizione a materiale organico con presenza di agenti infettivi o potenzialmente infetti (virus che includono ceppi oncogeni, batteri, parassiti, funghi, culture cellulari, campioni umani e biologici, animali da laboratorio, DNA ricombinante, ecc.).

La direttiva 2000/54/CE concerne la tutela dei lavoratori che manipolano microrganismi, culture cellulari, e parassiti umani capaci di causare infezioni, effetti tossici e allergie, includendo quelli impiegati nelle biotecnologie. L'articolo 14 prevede la sorveglianza sanitaria dei lavoratori esposti ad agenti senza fornire specifici esami medici. L'allegato IV specifica che il medico responsabile della sorveglianza sanitaria occupazionale deve essere consapevole di tali condizioni di lavoro e circostanze di esposizione e che la sorveglianza sanitaria deve comprendere la valutazione della salute dei lavoratori e, se necessario, il monitoraggio biologico con lo scopo di accertare effetti precoci e reversibili. I rischi per la salute umana relativi all'esposizione occupazionale a microrganismi geneticamente modificati concernono tre aree principali:

- immunopatologie, specialmente allergie
- effetti tossici, specialmente quelli relativi alla produzione di complessi proteici specie - specifiche
- infezioni legate a microrganismi wild-type oggetto di manipolazioni

Valutazione del rischio

Se da una parte la percezione del rischio di tipo biologico generalmente è molto elevata tra i lavoratori, in particolare in seguito all'emergere delle patologie da HIV, dall'altra esiste frequentemente una scarsa sensibilità alle misure di prevenzione per tale rischio, soprattutto se confrontate con quanto accade per gli altri tradizionali rischi di origine professionale, quali quelli di tipo chimico e fisico e con i fattori di rischio delle più comuni malattie cronico degenerative.

Per comprendere l'importanza della valutazione del rischio e dell'attuazione di misure di controllo e di prevenzione del rischio biologico è necessario fare alcune osservazioni sulle caratteristiche ed i meccanismi delle malattie infettive. L'instaurarsi di un **processo infettivo** si verifica quando la consistenza numerica dell'agente infettante sia tale da interessare, direttamente o attraverso l'elaborazione di sostanze tossiche, un numero sufficientemente elevato di cellule o, comunque, cellule dotate di peculiari o insostituibili funzioni, in modo da indurre la malattia.

La consistenza numerica dell'agente infettante, necessaria a tradurre un'infezione in malattia conclamata (espressa come **carica infettante**: quantità minima di agente biologico che penetra nell'organismo in grado di innescare il processo patogeno), è naturalmente variabile sia in funzione delle caratteristiche di patogenicità dell'agente infettante, sia in funzione della capacità di difesa immunitaria dell'organismo ospite. L'infezione si traduce costantemente in malattia conclamata tutte le volte che la patogenicità dell'agente infettante sia tale da superare le capacità difensive dell'organismo, oppure quando le difese antiinfettive dell'organismo siano compromesse al punto da impedirgli di contrapporsi all'azione patogena anche di modeste cariche infettanti.

La **contagiosità** delle malattie infettive dipende soprattutto dalla quantità di agenti eliminati all'esterno dell'organismo malato o presenti nell'ambiente, dalla via di eliminazione, dalla via di trasmissione e dalla capacità di sopravvivenza dell'agente infettante al di fuori dell'organismo infetto o dalla presenza dell'agente infettante, e dalla sua concentrazione, in liquidi biologici (sangue) trasmissibili ad opera di particolari vettori.

Nella dinamica del **processo infettivo** si riconoscono alcune tappe: contaminazione da parte di microrganismi di superfici cutanee o di mucose; penetrazione dei microrganismi nei tessuti profondi ed acces-

so al circolo ematico e linfatico; localizzazione in determinati organi e/o tessuti; infezione: rapporto dinamico tra microrganismo patogeno ed organismo, con risposta attiva del sistema immunitario dell'ospite. Solo dopo che l'infezione riesce ad interessare un certo numero di cellule o determinati organi vitali si ha la comparsa della sintomatologia clinica e l'inizio della malattia (superamento del periodo di incubazione).

Le **vie di trasmissione** degli agenti infettivi che rappresentano un aumentato rischio negli operatori sanitari sono:

- **trasmissione per contatto**
- **trasmissione per via aerea (droplet nuclei)**
- **trasmissione per contatto mediante particelle droplet**
- **trasmissione per via parenterale**
- **trasmissione oro-fecale**

La valutazione dei rischi costituisce quindi la necessaria premessa alla sorveglianza sanitaria e ne rappresenta uno dei criteri fondamentali. La valutazione del rischio biologico, peraltro, presenta aspetti peculiari rispetto a quella relativa a fattori di rischio chimico e fisico, i quali, al contrario dei biologici, sono misurabili.

Problematiche di sorveglianza sanitaria

Le considerazioni sopraesposte inducono a predisporre un programma di sorveglianza sanitaria che tenga conto di:

- Caratteristiche di pericolosità intrinseca dell'agente biologico, molto variabili in relazione a: *modalità di trasmissione, infettività, patogenicità, trasmissibilità, neutralizzabilità.*
- Oggettiva difficoltà nel misurare l'esposizione ad agenti biologici. Infatti, la determinazione quantitativa e qualitativa delle specie batteriche, virali o fungine aerodisperse risulta in genere complessa e non sono standardizzati metodi e parametri di riferimento; inoltre, la varietà biochimica e morfologica e l'ubiquitarità dei microrganismi rendono problematico il monitoraggio ambientale.
- Non disponibilità di curve dose-risposta. Infatti, per nessuno degli agenti biologici è definibile tale relazione, sia per gli effetti infet-

tivi, sia tossici, sia allergici. Quindi, non è possibile quantificare l'entità del rischio ed il verosimile danno ad esso conseguente.

- Non conoscenza di una dose soglia al di sotto della quale non esista un rischio per la salute. Infatti, per molti microrganismi, la dose minima infettante è stimabile intorno all'unità, ovvero è ritenuta sufficiente la contaminazione con l'agente biologico per poter generare infezione e malattia.
- Mancata esistenza di valori limite di esposizione, cui riferirsi per valutare il rischio.
- Fattori legati al lavoratore, identificabili con condizioni che comportano un aumentato rischio di contrarre malattie infettive, come le immunodeficienze congenite e acquisite (tali condizioni vanno, comunque, attentamente identificate, valutate nella loro gravità e monitorate caso per caso).

Si evince che non esiste per la patologia infettiva la possibilità di fissare a priori un rigido programma di visite mediche periodiche. Si dovranno, quindi, risolvere caso per caso i problemi posti tenendo conto che si hanno a disposizione una serie di strumenti da considerare parte integrante della sorveglianza sanitaria:

a) Sorveglianza delle esposizioni accidentali dei lavoratori

*Tale azione comporta la valutazione dell'incidenza ed il **follow-up** degli incidenti a rischio biologico. Con apposita inchiesta epidemiologica, è possibile infatti registrare i dati identificativi dell'infortunato, le modalità di accadimento (puntura, taglio, contatto con cute sana o lesa o con mucose).*

b) Informazioni derivanti dalla sorveglianza sanitaria dei lavoratori

Costituiscono il cardine delle attività preventive. In questa fase, può essere necessario effettuare accertamenti approfonditi ed ad ampio spettro, nel caso sia la visita di assunzione o venga richiesta una idoneità lavorativa ad una mansione che comporti esposizione a molteplici agenti biologici. Questa situazione è riscontrabile ad esempio nelle attività sanitarie. In altre situazioni, laddove il rischio biologico è circoscritto e ben identificabile, gli accertamenti potranno essere più mirati.

c) Anamnesi

Gli accertamenti medici in tale occasione cominciano evidentemente con l'anamnesi mirata, che integra quella familiare, fisiologica e patologica già raccolta nell'ambito della cartella sanitaria generale del lavoratore.

A nostro parere, essa deve essere condotta attraverso l'ausilio di questionari per valutare attentamente:

- **Anamnesi lavorativa**, in cui è importante descrivere il tipo di mansioni o attività a rischio biologico nonché le modalità di lavoro, classificandole in base al rischio (alto, medio, basso) ed in base alla frequenza (occasionale, frequente, continuativa). Ciascun lavoratore potrà dunque essere classificato sulla base del reale rischio cui è esposto.
- **Attività extralavorative** esponenti a rischio biologico (ad esempio agricoltura, allevamento, volontariato del soccorso, caccia, pesca).
- **Presenza di abitudini** o situazioni a rischio biologico (ad esempio tossicodipendenza endovenosa, piercing, tatuaggi, viaggi e soggiorni all'estero in zone ritenute a rischio).
- **Anamnesi patologica infettivologica**, con la quale si intende verificare eventuali patologie infettive pregresse, se il soggetto è stato sottoposto ad interventi chirurgici maggiori o procedure diagnostiche invasive, dialisi, emotrasfusioni, agopuntura, cure odontoiatriche rilevanti.
- **Ricerca delle condizioni di ipersuscettibilità**. È un elemento fondamentale delle visite preventive. In generale, possono costituire condizioni di ipersuscettibilità individuale nei confronti del RB le patologie della cute e delle mucose che ne riducono le proprietà di barriera, le flogosi in atto, i deficit immunologici congeniti ed acquisiti, la gravidanza, la non effettuazione di immunoprofilassi.

d) Valutazione dello stato di immunizzazione

Può essere effettuato valutando lo stato di immunizzazione del soggetto, attraverso test di laboratorio da calibrare a seconda dell'ambiente di lavoro specifico.

Va rilevato a questo proposito, che attualmente esistono vaccini efficaci (Tab. IV) per quei lavoratori che non sono già immuni al-

l'agente biologico presente nella lavorazione, da somministrare a cura del medico addetto alla sorveglianza sanitaria.

Caso per caso, a seconda del rischio biologico, il medico dovrà considerare l'opportunità di effettuare un vaccino in base alla sua efficacia, alla durata della copertura anticorpale, ad eventuali controindicazioni alla somministrazione.

e) Visita medica

È certamente importante, in quanto oltre a valutare lo stato di salute generale, consente di rilevare le condizioni dei vari organi ed apparati che possono essere bersaglio degli agenti biologici, nonché i segni clinici di patologie che possono condizionare l'ipersuscettibilità individuale.

Bisogna tuttavia riconoscere la scarsa sensibilità dell'esame clinico ai fini della evidenziazione precoce degli effetti biologici.

f) Esami di laboratorio

In fase di accertamenti preventivi, è proponibile l'effettuazione di esami che consentano di valutare lo stato di salute in generale, quali esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, glicemia, creatininemia, transaminasemia, gGT, elettroforesi delle proteine sieriche, esame delle urine completo.

g) Visite mediche periodiche

L'attuale legislazione non prevede esplicitamente alcuna sorveglianza sanitaria periodica per i lavoratori a rischio biologico; pertanto, sarà il medico a decidere quali lavoratori sottoporre a sorveglianza sanitaria e con quali modalità.

Considerazioni conclusive

Da quanto sopra esposto, risulta evidente che la sorveglianza sanitaria è uno degli elementi che, unitamente alla valutazione dei rischi condotta nei termini sopracitati, concorre al controllo del rischio biologico negli ambienti di lavoro.

In questo contesto, nella sorveglianza sanitaria assume rilievo fondamentale il sistema di sorveglianza epidemiologica, inteso come osservatorio che deve essere istituito in ciascun ambiente di lavoro. Ciò comporta l'obbligo di identificazione dei rischi, la loro quantificazione, la classificazione di aree, mansioni o attività secondo livelli di rischio.

L'osservatorio così costruito consente di utilizzare al meglio i dati sia della valutazione dei rischi che della sorveglianza sanitaria e di raggiungere una migliore qualità delle verifiche di efficacia della sorveglianza sanitaria. Inoltre, tale modalità di rilevazione potrà fornire utili orientamenti per l'attuazione di interventi preventivi secondo priorità.

Per il lavoro che implica la manipolazione di microrganismi geneticamente modificati (OGM), devono essere tenuti in considerazione i test diagnostici indicanti esposizione, contatto e possibile colonizzazione e/o infezione da OGM e loro prodotti. Per esempio, per i lavoratori che manipolano OGM di classe II, le infezioni causate da vettori retrovirali possono essere scoperte monitorando l'espressione delle proteine retrovirali, cercando il virus infettante e identificando la risposta immunologica a questi. La manipolazione di OGM di classe I, quelli a basso rischio per effetti avversi alla salute umana, potrebbe provocare un rischio di contaminazione con prodotti genetici e, poiché alcuni di questi possono essere utilizzati come vettori per il trasferimento di geni nelle cellule eucariotiche, questi potrebbero - anche se ciò è improbabile - essere inseriti nel genoma dei lavoratori esposti.

Tabella IV - Agenti biologici per i quali è disponibile un vaccino

Bordetella pertussis	Febbre gialla
Clostridium tetani	Virus dell'epatite B
Corynebacterium diphtheriae	Virus dell'epatite D
Haemophilus influenzae	Virus influenzale tipi A, B
Mycobacterium africanum	Virus del morbillo
Mycobacterium bovis	Virus della parotite
Mycobacterium tuberculosis	Virus dell'epatite A
Neisseria meningitis	Virus della poliomielite
Salmonella paratyphi A, B, C	Monkeypox virus
Salmonella typhi	Variola (mayor & minor) virus
Yersinia pestis	Withepox virus (variola virus)
Febbre della Valle del Rift	Virus della rabbia
Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa Centrale	Encefalomielite equina dell'America dell'est
Encefalite B giapponese	Encefalomielite equina del Venezuela
Foresta di Kyasanur	Encefalomielite equina dell'America dell'ovest
Omsk	Rubivirus (rubella)
Encefalite verno-estiva russa	

Rischi chimici

I lavoratori impegnati nella ricerca biotecnologica sono esposti ad una varietà di sostanze chimiche potenzialmente nocive. I tipi di esposizione differiscono da quelli in altri ambienti lavorativi in diversi punti: essi includono molti agenti conosciuti per la loro azione genotossica. Per l'uomo non può essere pienamente valutata la tossicità di alcuni agenti chimici e delle loro miscele, e una adeguata decontaminazione o tecniche distruttive non sono sempre valide né frequentemente usate. Le tecniche cambiano velocemente nella ricerca biotecnologica, specialmente con lo sviluppo della biologia molecolare e i conseguenti cambiamenti nei prodotti usati. Queste caratteristiche, unite ad un lavoro ambientale veramente competitivo, spiegano perché la sorveglianza oggettiva delle condizioni di lavoro, essenzialmente basata sul grado di osservanza delle “ Buone Tecniche di Laboratorio” e la sorveglianza sanitaria specifica, siano estremamente difficili.

La serie di agenti manipolati oggi nella ricerca biotecnologica comprende solventi, alchilanti, intercalanti, ammine aromatiche, ormoni, metalli pesanti, ecc. Molte sostanze quali solventi, una volta erano considerate innocue ed erano manipolate senza precauzioni prima che venisse suggerito, alla fine degli anni '70, che potevano avere effetti avversi a lungo termine. Al contrario le sostanze conosciute con un'elevata tossicità immediata erano manipolate con maggior attenzione, ma i loro effetti a lungo termine **a bassi livelli di esposizione** non erano conosciuti.

L'uso di maschere in laboratorio divenne largamente diffuso dal 1970, così come lo sviluppo di metodi strumentali che richiedevano minori quantità di sostanze chimiche.

Queste evoluzioni, e probabilmente la migliore protezione della pelle con i guanti, hanno concretamente ridotto i livelli di esposizione in laboratorio, ma le sorgenti sono numerose.

Le esposizioni multiple considerate oggi introducono difficoltà metodologiche ulteriori nella programmazione e implementazioni epidemiologiche. In contrasto con i processi lavorativi dell'industria chimica, le persone che lavorano in laboratorio sono esposte ad una

maggior varietà di agenti da sorgenti diverse - biochimiche, fisiche o biologiche - ma probabilmente ai più bassi livelli. Questo può spiegare perché nessuno studio ha sinora stabilito quantitativamente l'esposizione specifica. Infatti la maggior parte degli studi non ha definito le esposizioni multiple.

Le più comuni sostanze utilizzate nei laboratori possono esercitare il loro effetto in forma acuta o cronica. Gli effetti sono in rapporto con i tempi di esposizione e con la quantità della sostanza presente nell'aria o nell'ambiente, con la via di ingresso e con le proprietà fisico-chimiche degli inquinanti presenti. Gli effetti possono essere influenzati dalla presenza di altri composti chimici o dall'uso di medicinali o di sostanze voluttuarie.

Le caratteristiche di esposizioni multiple e a basse dosi di diversi agenti chimici rendono estremamente complicato identificare, nell'ambito di un programma di sorveglianza sanitaria, degli indicatori specifici che possano fornire segni preclinici provocati da un particolare agente chimico.

Per alcune sostanze chimiche la stima di esposizione mediante monitoraggio è basata su molti studi con risultati uniformi ed attendibili mentre per altri c'è ancora una grande incertezza.

La valutazione del rischio della salute mediante l'utilizzo di biomarcatori di esposizione è possibile solo per pochi agenti chimici. La Tab. V riporta alcune delle sostanze chimiche usate nei laboratori di ricerca biotecnologica ed i relativi biomarcatori.

Un aspetto particolare è quello relativo alla possibilità di utilizzare appropriati test definiti come "indicatori di esposizione integrata", utili particolarmente quando non si conosca l'esatta composizione delle sostanze a cui il soggetto è esposto, o le concentrazioni di alcune di esse siano particolarmente basse e pertanto difficilmente misurabili. Tra gli indicatori di esposizione integrata possono essere considerati quei test che permettono di valutare la funzionalità degli enzimi microsomiali epatici, proposti per il monitoraggio biologico di molti solventi.

Tabella V - Principali agenti chimici utilizzati in laboratorio, loro eventuale cancerogenicità e biomarcatori

SOSTANZE CHIMICHE UTILIZZATE IN-LABORATORIO	MARCATORI DI ESPOSIZIONE
Acetone	Acetone nelle urine
Arsenico*	Metaboliti dell'arsenico inorganico nelle urine
Benzene*	Acido S- enilmercaptopurico nelle urine
Luminolo	
M - xilene	Acido metil ippurico nelle urine
Mercurio	Mercurio totale nel sangue nelle urine
Metanolo	Metanolo nelle urine
O - xilene	Acido metil ippurico nelle urine
P - xilene	Acido metil ippurico nelle urine
Fenolo	Fenolo nelle urine
Fenilmetilsulfonil fluoride	Fluoride nelle urine
Tetraidrofurano	
Toluene	O – cresol nelle urine, acido ippurico nelle urine e toluene nel sangue
Tricloro etilene*	Acido Tricloroacetico e tricloroetano nelle urine, tricloroetano nel sangue tricloroetilene nell'aria espirata, tricloroetilene nel sangue
Xilene	Acido metil ippurico nelle urine

* Cancerogeno

Rischi cancerogeni

Alcuni degli agenti chimici utilizzati in laboratorio hanno proprietà cancerogene; nei confronti di tali sostanze la sorveglianza sanitaria rappresenta una delle misure di prevenzione che costituiscono la strategia (Tab. VI) la cui efficacia dipende da una completa e contemporanea adozione di tutti i provvedimenti; l'adozione di una parte soltanto di essa non è da ritenere soddisfacente dal punto di vista preventivo.

Tabella VI - Strategie di prevenzione per esposti ad agenti cancerogeni

- Valutazione del grado, natura e durata dell'esposizione dei lavoratori
- Sostituzione o riduzione dell'uso di un agente cancerogeno
- Adozione di sistemi chiusi
- Riduzione del livello di esposizione al più basso valore tecnicamente possibile
- Limitazione della quantità di un agente cancerogeno
- Massima riduzione possibile dei lavoratori esposti
- Evacuazione alla fonte degli agenti cancerogeni
- Applicazione di procedura e metodi di lavoro adeguati
- Misure di protezione collettiva e/o individuale
- Divieti di mangiare, bere e fumare nelle aree di lavoro in cui esiste rischio di contaminazione ad opera di agenti cancerogeni

Ogni lavoratore deve, inoltre, essere sottoposto ad un'ideale sorveglianza sanitaria prima dell'inizio dell'esposizione e, in seguito, ad intervalli regolari.

È sconsigliato il ricorso a test per effetti biologici precoci in quanto la predittività di questi effetti nei confronti della successiva comparsa di un tumore è tuttora oggetto di discussione e non sono disponibili criteri validati che consentano di attribuire le variazioni dall'ambito di normalità a specifici agenti presenti nell'ambiente di lavoro. Inoltre si sottolinea che nel caso di risultati negativi con i test utilizzati, non si può in alcun modo escludere che vi siano stati effetti di altro genere.

Comunque il quadro normativo impone la sorveglianza sanitaria sugli esposti a cancerogeni e, pertanto, vengono fornite indicazioni generiche sulla necessità di un controllo sanitario accurato, a cadenza almeno annuale, eventualmente corredato da accertamenti complementari, utile soprattutto quale occasione per fornire ai lavoratori le informazioni sul significato e sui limiti della sorveglianza sanitaria stessa nonché sulle norme generali e specifiche di prevenzione.

È evidente che questa impostazione privilegia, correttamente, la prevenzione primaria e non attribuisce, forse troppo categoricamente, particolare importanza alla prevenzione secondaria.

Questa impostazione non tiene però conto della necessità "etica" di provvedere, una volta definita la figura dell'esposto a cancerogeni, la miglior sorveglianza scientificamente possibile e, in quest'ottica, appare riduttivo il rifiuto aprioristico di test precoci che consentano di

intervenire in fasi iniziali del processo di cancerogenesi o, per lo meno, nel periodo preclinico. Si tratta piuttosto di valutarne il significato.

Negli anni recenti sono stati proposti e resi in parte disponibili strumenti atti a rilevare “effetti precoci” di cui è opportuna una disamina sul piano del loro significato prima di valutarne la fattibilità pratica.

Una serie di marcatori, denominati complessivamente citogenetici, riguarda più da vicino alterazioni a carico del patrimonio genetico cellulare, rappresentate principalmente dalle aberrazioni cromosomiche, dagli scambi fra cromatidi fratelli (SCE) e dai micronuclei; tutti markers non specifici di risposta biologica.

Per i carcinogeni chimici si utilizzano soprattutto le SCE: il loro studio è cominciato sui pazienti in trattamento con chemioterapici; indotte così acutamente, scompaiono pochi mesi dopo il termine della terapia. Sono aberrazioni più localizzate (cromatidiche), risentono di confondenti, età e fumo di sigaretta in testa, ma vengono valutate più sensibili, e di determinazione più rapida e semplice delle aberrazioni cromosomiche. Sono marcatori di lesioni precoci, non specifici di una sostanza chimica, pertanto non in condizione di portare ad identificare, e quindi a quantificare, l'agente che li determina. Pertanto hanno solo valore di gruppo, sempreché siano ben testati i confondenti.

Il conteggio dei micronuclei nei linfociti periferici, una tecnica molto più rapida dell'esame per aberrazioni cromosomiche e SCE, ha dimostrato anzitutto la loro persistenza prolungata. La loro quantificazione corretta, tuttavia, viene giudicata difficile.

Volendo dare una valutazione complessiva dei tre indicatori citogenetici più utilizzati, anzitutto possiamo dire che, nel singolo individuo, essi sono, al minimo, un marker di esposizione personale; che in vitro e nell'animale sono state stabilite correlazioni positive tra la loro comparsa e la citotossicità, la mutazione, la trasformazione e la formazione di un tumore. Hanno un valore predittivo in senso tumorale se presenti in cellule germinali, come si osserva in cancri assai rari, quale il retinoblastoma. Ne viene consigliato l'uso in associazione con gli addotti: prodotti di addizione ottenuti dalla reazione tra specie chimiche e macromolecole biologiche (DNA e protezione), con formazione di legami covalenti.

Se per qualcuno un riscontro marcato di aberrazioni cromosomiche,

semprechè sia dato di osservarlo, potrebbe essere utilizzato non solo come indicatore di esposizione, ma anche di effetto alla salute, per altri esse hanno dato risultati contraddittori. Riflettono l'esposizione cumulativa ed indicano un effetto genotossico di gruppo potendo avere, se ripetutamente confermate rispetto agli indispensabili gruppi di controllo, valore di segnale d'allerta. Questo, soprattutto, perché, nella pratica, questi effetti non sono mai clamorosi; poi, non si è mai dimostrata, in popolazioni professionalmente esposte, una loro correlazione significativa con la risposta, vale a dire con l'insorgenza di tumori.

Pertanto si apre il problema di come indirizzarci nella sorveglianza di questo ventaglio di rischi e di target. Già si profilano non una, ma più direttrici lungo le quali dipanare la traccia della sorveglianza sanitaria. Infatti, il conoscere l'oncogeno specifico ed il tumore che esso può provocare consente di utilizzare una linea più caratterizzata, comprendente misure di dose interna, dosimetria molecolare inclusa e una scelta razionale degli indicatori di dose biologica effettiva e degli effetti biologici precoci in cellule somatiche o germinali. Se invece non conosciamo l'agente specifico di un determinato tipo di tumore professionale, il problema diventa molto più complesso e non si individuano soluzioni pratiche, in quanto la prospettata applicazione di indicatori aspecifici, quali la mutagenicità urinaria e le aberrazioni cromosomiche, non offre risultati di univoca interpretazione.

Rischi fisici

Alcuni rischi fisici che possono essere presenti nei laboratori di biotecnologia sono rappresentati dalle radiazioni ionizzanti e non ionizzanti.

Radiazioni ionizzanti

La sorveglianza medica nei confronti di radiazioni ionizzanti utilizzate (Raggi X, ^{32}P , ecc.) consiste, sinteticamente, in una serie di atti medici specifici di natura diagnostica, prognostica e terapeutica e viene effettuata mediante valutazioni di varia natura, che riguardano complessivamente:

- l'accertamento preventivo e la verifica periodica dell'idoneità al lavoro, in base al rischio specifico cui il dipendente è esposto, nonché la programmazione e la valutazione degli accertamenti specialistici e di dosimetria biologica, con trasmissione per iscritto dei giudizi di idoneità al datore di lavoro
- l'attività di intervento diagnostico e terapeutico in caso di sovraesposizione o contaminazione accidentale
- l'attività medico-legale, concernente gli archivi sanitari e dosimetrici obbligatori per legge, nonché le valutazioni, denunce e segnalazioni per eventuali infortuni e malattie professionali

Per l'impostazione razionale di un programma di sorveglianza medica preventiva e periodica sui lavoratori esposti al rischio da radiazioni ionizzanti, si possono seguire almeno tre approcci:

- di tipo clinico, rivolto all'individuazione nel singolo lavoratore di alterazioni dello stato di salute attribuibili alle radiazioni *stes-se*, mediante accertamenti diagnostici mirati
- di tipo epidemiologico, fondato sull'osservazione clinica di gruppi omogenei di soggetti esposti ad analoghi rischi con modalità equivalenti
- di tipo preventivo, finalizzato alla valutazione dell'idoneità al lavoro e, quindi, rivolto all'evidenziazione clinica di eventuali controindicazioni all'esposizione lavorativa al rischio specifico

Facendo riferimento alle premesse iniziali è opportuno sottolineare che la radioprotezione si va sempre più delineando come un settore multidisciplinare, a forte contenuto fisico, medico, biologico, tecnico ed ecologico, con un'importante interfaccia verso le scienze sociali. Le raccomandazioni dell'ICRP sull'argomento sono in genere riconosciute come il più autorevole mezzo per fare il punto della situazione in questo settore, ove appare necessario dare maggiore impulso allo studio degli aspetti fondamentali dell'interazione tra radiazione e materia biologica, sviluppando una radiobiologia "moderna", attenta ai progressi nei settori affini, inclusi quelli compiuti in tempi recenti dalla biologia molecolare.

Le radiazioni non ionizzanti

Tra le radiazioni non ionizzanti accenneremo alle radiazioni ultraviolette tralasciando di parlare delle radiofrequenze e dei campi magnetici in quanto questi ultimi non sono rischi particolarmente presenti nei laboratori.

I raggi ultravioletti sono la porzione dello spettro delle onde elettromagnetiche che stanno tra i raggi X a maggiore lunghezza d'onda e la luce visibile a più corta lunghezza d'onda e quindi con l'aumentare della frequenza nello spettro UV si distinguono 4 zone:

- zona “near” cioè vicina al visibile, per raggi UV con lunghezza d'onda tra 320 e 400 nm. Per la componente UV di provenienza solare è la porzione assorbita dall'ozono degli strati superiori dell'atmosfera
- zona “middle” tra 320 e 280 nm, trasmesse attraverso il vetro;
- zona “far” tra 280 e 160 nm, assorbite dal vetro e trasmesse attraverso l'aria e il quarzo
- zona “vacuum” sotto i 160 nm che possono esistere solo nel vuoto o in un gas inerte confinato. In laboratorio, una esposizione a raggi UV può accadere in diverse circostanze: nel corso della sterilizzazione degli ambienti con lampade a luce UV; nella evidenziazione di composti chimici utilizzando lampade UV (con una lunghezza d'onda di 366 nm) nel corso di analisi di cromatografia su strato sottile, su carta e nell'utilizzo di tecniche elettroforetiche. I più comuni effetti osservabili nelle esposizioni professionali sono: eritema cutaneo, cheratocongintivite, diceratosi cronica delle pareti esposte, tumori della pelle.

La sorveglianza medica per il rischio radiazioni ottiche e da laser comprende essenzialmente visite oculistiche e dermatologiche, oltre all'accertamento dello stato generale di salute del soggetto effettuate secondo i criteri della medicina preventiva. La visita oculistica dovrà comprendere, tra l'altro, l'esame dell'acutezza visiva e del fondo, nonché la biomicroscopia con lampada a fessura, la retinografia, soprattutto se a colori, costituirà una interessante integrazione della documentazione clinica. Anche per la visita dermatologica potrà risultare utile l'indagine fotografica e un esame alla luce di Wood.

Bibliografia

- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutations Research*, 463: 111-172. (2000).
- Alessio L., Porru S. Criteri e metodi di controllo periodico dei lavoratori esposti a rischio biologico. 62° Cong.Naz.Soc.It.Med.Lav.Ig. Ind. Genova 29 settembre-2 ottobre 1999.
- Alessio L., Apostoli P., Crippa M. Esposizioni multiple. 56°Cong. Naz. Soc. It. Med. Lav. Ig. Ind. Venezia 20-23 ottobre 1993.
- Cordier S., Mousel M.L. Le Goaster C., et al. Cancer risk among workers in biomedical research. *Scand J Work Environ Health*, 21: 450-9. (1995).
- Franco G., Alessio L., Saia B. La sorveglianza sanitaria. Scopo, strumenti, efficacia, prospettive. *G. Ital. Med. Lav.Erg.*,21:2: 108-113. (1999).
- Mosconi G., Barbieri G., Cantoni S., et al. La sorveglianza sanitaria: dalla presunzione del rischio alla valutazione del rischio. *G.Ital.Med.Lav.Erg.*, 22:2: 156-161. (2000).
- Racht B., Partanen T., Kauppinen T., Sasco A.J. Cancer Risk in Laboratory Workers: An Emphasis on Biological Research. *American journal of industrial medicine* 2000, 38: 651-665 (2000).
- Pira E., Piolatto P. G., Scansetti G. Criteri e metodi per il controllo periodico dei lavoratori esposti a cancerogeni. 62° Cong. Naz. Soc. It. Med. Lav. Ig. Ind. Genova 29 settembre-2 ottobre 1999.

PRECAUZIONI PER L'USO DI AGENTI BIOLOGICI E CHIMICI

Mariangela Miele, Bernardetta Ledda, Francesca Cavalli, Dimitri Sossai

Nei laboratori di ricerca biotecnologica si manipola una grande varietà, di agenti biologici e composti chimici che essere pericolosi per la salute e l'ambiente. Un elenco di tutti gli agenti ed i composti utilizzati e di conseguenza dei rischi presenti in un laboratorio risulterebbe poco esauriente. Il presente manuale si limita a fornire alcune informazioni per permettere ai ricercatori di definire le precauzioni da prendere anche quando non esistano precise indicazioni dalle normative in vigore.

Nella tabella IV sono mostrati i principali agenti chimici e fisici usati per decontaminazione, disinfezione e sterilizzazione.

Nelle tabelle V e VI si riportano le principali fonti di rischio biologico e chimico rispettivamente. Le tabelle forniscono indicazioni utili al fine di evitare o diminuire la contaminazione durante le operazioni che più frequentemente si svolgono nei laboratori (David, 1997; Sambrook et al. 1989):

- amplificazione e Polymerase Chain Reaction (PCR) per DNA ed RNA
- analisi e manipolazione di DNA, RNA e oligonucleotidi
- creazione di banche di DNA ricombinante-preparazione di inserti per il clonaggio
- estrazione di DNA da cellule animali, vegetali e batteriche
- estrazione di DNA plasmidico
- introduzione di DNA in cellule di mammifero, vegetali e batteriche
- sequenziamento genico
- tecniche di ibridazione
- utilizzo di vettori nella preparazione di DNA a partire da lisati fagici

Si ricorda comunque che prima di utilizzare un composto chimico bisogna leggere attentamente le schede tossicologiche ed informarsi sulle precauzioni da utilizzare.

Tabella IV. Principali agenti chimici e fisici usati per Decontaminazione* (De), Disinfezione (Di) e Sterilizzazione*** (S)**

AGENTE CHIMICO O FISICO	ATTIVITA'	VANTAGGI	USO	OSSERVAZIONI
Alcoli (etanolo, alcol isopropilico) <i>De, Di</i>	-denaturano le proteine -inibiscono il metabolismo cellulare	-basso costo -bassa tossicità -alta attività su batteri e micobatteri -scarsa attività su virus -non interagiscono con detergenti	-eccellenti antisettici su pelle integra	-inattivati dallo sporco -scarsamente inattivati da proteine, materiali naturali, materiali sintetici, acqua dura - facilmente infiammabili -scarsa tossicità per gli occhi -attività nulla su funghi e spore
Aldeidi <i>St</i>	-denaturano le proteine -alchilano DNA ed RNA	-attivo su batteri, micobatteri, spore (oltre 40°C la Formaldeide, oltre 20°C la Glutaraldeide) e funghi -poco attivo su virus	-sterilizzazione di strumentazione termolabile	-temperatura, tempi di contatto e pH dipendenti -alta tossicità (la formaldeide è cancerogena) -scarsamente inattivati da proteine, materiali naturali, materiali sintetici, acqua dura (non utilizzare Glutaraldeide con le proteine) -scarsa tossicità per pelle, occhi, polmoni; possibili effetti allergici e irritanti
Clorexidina <i>De, Di</i>	-interagisce con le membrane cellulari	-bassa tossicità -attivo sullo sporco	-antisettico topico su ferite ed escoriazioni	-incompatibile con detergenti anionici
Ipoclorito di sodio <i>De, Di</i>	-ossida i legami peptidici -denatura le proteine	-basso costo -ampio spettro -facilmente reperibile -alta attività su batteri -discreta attività su micobatteri e spore -scarsa attività su virus e funghi	-igienizzante delle superfici -trattabile con acqua	-pH sensibile - si lega a sostanze organiche come le ammine -scarsa tossicità per pelle, occhi, polmoni -inattivato da proteine -scarsamente inattivato da materiali naturali, sintetici, acqua dura e detergenti cationici - non utilizzabile con acidi e basi forti

EDTA (Ac. Etilen-Diammintetra-Acetico) <i>De, Di</i>	- aumenta la permeabilità di pareti e membrane cellulari	- migliora l'efficacia degli antibiotici	- Pseudomonas - Proteus - Staphylococcus	- bassa attività battericida - non ad ampio spettro - irritante
Ossido di Etilene <i>St</i>	- alchila gli acidi nucleici (DNA)	- alta attività battericida	- sterilizzazione di materiali termolabili	- cancerogeno - tossico - mutageno - infiammabile - esplosivo
Iodio <i>Di</i>	- interrompe i meccanismi di trasporto dell'ossigeno	- sporicida - cisticida	- antisettico chirurgico cutaneo	- tossico - attivo solo in certe forme
Perossidi (perossido di idrogeno, gas plasma) <i>St</i>	- dissolvono le pareti cellulari - denaturano le proteine	- basso costo (perossido di idrogeno) - non inquinante per l'ambiente - non tossico per i tessuti biologici	- sterilizzazione di strumenti di laboratorio e piccole attrezzature	- citotossici - poco stabile - strumentazione costosa (per il gas plasma) - scarsa efficacia in presenza di materiale organico
Ozono <i>Di</i>	- "super ossigeno" nativo - ossida proteine e lipidi insaturi	- si dissolve in acqua - non lascia residui	- disinfettante dell'acqua	- instabile - irritante
Fenoli <i>Di</i>	- penetrano la parete cellulare - denaturano le proteine	- penetrano i legni e le superfici porose - alta attività su funghi, batteri - discreta attività su micobatteri - scarsa attività su virus	- antisettici topici - disinfettanti ambientali	- tossici, corrosivi - minima attività sporicida - discretamente inattivati da materiali naturali e sintetici - scarsamente inattivati da proteine e acqua dura - penetrano facilmente attraverso la pelle - irritanti
Ammonio quaternario e sali fenolici d'ammonio quaternario <i>De, Di</i>	- interagisce con le membrane cellulari pregiudicandone la permeabilità	- surfattanti che distruggono i lipidi - utilizzabile su superfici - generalmente non tossico per i mammiferi	- disinfettante ambientale	- inattivato dai lipidi

Calore umido sotto pressione (autoclave) <i>St</i>	- denatura proteine ed acidi nucleici	- attivo su batteri, micobatteri, funghi e virus - migliore sistema sporicida	- strumenti e piccole attrezzature resistenti ad alte pressioni (1-3 bar) e ad alte temperature (120-130 °C)	- distrugge i materiali termolabili - inefficace contro organismi resistenti al vapore
Calore secco (stufa ad aria calda) <i>Di</i> (100°C per 1 h), <i>St</i> (160°C per 2 h, 170°C per 1 h) <i>St</i>	- denatura proteine ed acidi nucleici	- attivo su batteri, micobatteri, spore, funghi e virus	- sterilizzazione di materiali impermeabili o danneggiabili dall'umidità (vetro, strumenti affilati, metallo)	- distruttivo per materiali che non resistono alle alte temperature per lunghi periodi di tempo
Luce ultravioletta <i>St</i>	- agisce sul DNA e crea dimeri di timidina	- poco costoso - ampio spettro	- sterilizzazione di superfici, acqua, aria	- agisce in superficie, agisce in uno spazio estremamente limitato e richiedono una corretta manutenzione con frequenti pulizie della lampada; basta un sottile strato di polvere per vanificare il funzionamento - provoca tumori alla pelle
Radiazioni gamma <i>St</i>	- denatura il DNA, le proteine e le pareti cellulari	- rapido - ampio spettro	- strumenti e piccole attrezzature	- richiede attrezzature costose

***Decontaminazione:** distruzione della maggior parte dei microorganismi; è sempre integrata con sterilizzazione o disinfezione dei materiali venuti a contatto con i patogeni.

****Disinfezione:** eliminazione della maggior parte o di tutti i microorganismi patogeni (tranne le spore) da oggetti inanimati. L'agente utilizzato è detto *disinfettante*, quando applicato su oggetti ed ambienti, *antisettico* per tessuti viventi (cute, mucose) e generalmente, ha un suo specifico organismo bersaglio. Di solito il processo per la disinfezione si utilizzano di sostanze chimiche o la pastorizzazione.

*****Sterilizzazione:** completa eliminazione o distruzione di tutte le forme di vita microbiche. Ha un'azione ad ampio spettro agendo su: microorganismi patogeni e non, spore e forme vegetative. L'agente utilizzato è detto *sterilizzante* (battericida, germicida). Si applica sia negli ospedali che nei laboratori di ricerca con processi chimici o fisici. Le più comuni applicazioni sono: sterilizzazione con vapore (autoclave), calore secco (stufa ad aria calda), sterilizzazione con gas (ossido di etilene, ozono), agenti chimici.

Tabella V. Principali fonti di rischio biologico nei laboratori di ricerca

ATTIVITÀ	RISCHIO	PREVENZIONE
Ibridazione	Natura delle sonde e dei tessuti (umani, animali o vegetali). Il rischio legato all'uso delle sonde è limitato all'impiego degli oligonucleotidi.	Classiche precauzioni applicate per i campioni potenzialmente infetti. Per evitare possibili infezioni, manipolare in condizioni di sterilità.
Immortalizzazione di cellule tramite vettori virali.	Il contatto con la pelle può essere causa di tumori. Formazione di aereosol.	Precisa determinazione del rischio. Utilizzare il maggior livello di sicurezza disponibile. Ridurre la formazione di aereosol.
Manipolazione di liquidi biologici (sangue, plasma, siero) e cellule o tessuti provenienti da materiale infetto.	Rischi legati ai campionamenti. Formazione di aereosol.	Manipolare considerando tutto come infetto. Evitare il contatto cutaneo con cellule o tessuti. Ridurre la formazione di aereosol. Gestire i rifiuti in modo adeguato.
Natura delle colonie batteriche e delle cellule umane, animali e vegetali utilizzate.	Rischio di contaminazione (colonie batteriche) e di possibile infezione (cellule umane, animali e vegetali). I rischi possono essere dovuti alla natura dell'inserto, delle cellule o di siero od altri agenti che possano stimolare proliferazioni indesiderate della coltura. Formazione di aereosol.	Manipolare con guanti testati per la protezione da micro-organismi, maschere facciali (parziali o totali, per la protezione del tratto respiratorio) e maschere con auto respiratori. *
Natura del DNA (batterico, animale, vegetale, plasmidi, geni codificanti per tossine, sequenze di natura sconosciuta, DNA da sequenziare) e vettori.	Formazione di aereosol.	Manipolare con guanti e maschera sotto cappa. Eliminare in modo adeguato i rifiuti anche per la tutela dell'ambiente. Evitare il contatto con la pelle e l'ingestione.

ATTIVITÀ	RISCHIO	PREVENZIONE
Natura dell'RNA	Cellule: possibile infezione. Animali: possibili infezioni. Batteri: rischio di contaminazione.	Evitare il contatto cutaneo (maneggiare coi guanti) e l'ingestione. Eliminare in modo adeguato i rifiuti anche a tutela dell'ambiente.
Natura del vettore e dell'inserito.	Pericolosi per contatto e per l'ambiente.	Evitare il contatto cutaneo e l'ingestione. Adottare tutte le precauzioni a tutela ambientale.
Pericoli specifici per l'utilizzo dei retrovirus.	Possibilità di contaminazione tramite aerosol.	Utilizzare adeguati livelli di contenimento.
Vettori batteriofagi contenenti un inserto modificato: rischi dovuti all'inserimento di nuove sequenze, con nuovi e imprevedibili metodi di auto-propagazione.	Possibilità di contaminazione tramite aerosol.	Precisa determinazione del livello di contenimento (> L1), per evitare la diffusione. Mantenere l'immunodeficienza sotto controllo. Evitare il contatto cutaneo e gli aerosol. Verificare l'esistenza di speciali misure di sicurezza, in relazione all'organismo trattato. Creazione di un piano d'emergenza.

* Per quanto riguarda le maschere, l'efficienza nei confronti delle particelle submicroniche (polveri ultrafini e aerosol), i sistemi filtranti usati devono avere un'efficienza di almeno il 99,99% su particelle di 0,3 micrometri (classe P3), secondo la regolamentazione EN 143; si tratta delle uniche maschere efficaci per la protezione dal rischio biologico. I guanti devono essere del tipo testato al Φ X174 per la protezione da micro-organismi (secondo EN 374).

Tabella VI. Principali fonti di rischio chimico nei laboratori di ricerca.

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Acido acetico glaciale	Irritante Sprigiona vapori fortemente irritanti Evitare l'inalazione, il contatto cutaneo e con gli occhi	1, 2, 4
Anidride acetica	Corrosivo, - infiammabile Sprigiona vapori fortemente irritanti Evitare l'inalazione, il contatto con gli occhi	1, 2, 4
Acetonitrile	Infiammabile Tossico	1, 2, 3
Acrilamide	Neurotossico , allergenico, cancerogeno, neurotossico quandosi trova in forma non polimerizzata	1, 2, 3
Actinomicina D	Molto tossica	1, 2, 3
Adenina emiosolfato	Irritante	1, 2, 4
Alluminio cloruro	Irritante	1, 2, 4
Amiprophos metile	Nocivo	1, 2, 4
Ammonio acetato	Irritante	1, 2, 4
Ammonio cloruro	Irritante	1, 2, 4
Ammonio diidrogeno fosfato	Irritante	1, 2, 4
Ammonio idrogeno carbonato	Nocivo	1, 2
Ammonio nitrato	Irritante Ossidante Provoca reazioni violente con sostanze riducenti	1, 2, 4
Ammonio perossodisolfato (ammonio persolfato, APS)	Nocivo, ossidante, allergenico Provoca reazioni violente con sostanze riducenti	1, 2, 3
Ammonio solfato	Irritante	1, 2, 4
Amfotericina B	Nocivo	1, 2, 3
Amsacrina	Molto tossico	1, 2, 3
Antibiotici	Nocivo Irritante - allergenico Rischi legati all'antibiotico-resistenza	1, 2, 3
Argento nitrato	Corrosivo Inquinante ambientale	1, 2, 4
L-Arginina	Irritante	1, 2, 4
BES (acido N,N-bis [2-idrossimetil] -2-amminoetansulfonico)	Irritante	1, 2, 4

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Bleomicina solfato	Nocivo -irritante	1, 2, 3
Acido Borico	Nocivo	1, 2, 3
5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), X-Phos	Tossico	1, 2, 3
Blu di Bromofenolo (3',3'',5',5''-tetrabromofenol-sulfonfaleina) sale di sodio	Nocivo	1, 2, 3
Cesio cloruro	Nocivo	1, 2, 3
Calcio cloruro	Irritante	1, 2, 4
Calcio nitrato	Irritante Provoca reazioni violente con sostanze riducenti	1, 2, 4
Carboxin (5,6-diidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilide)	Nocivo	1, 2, 3
Cellulasi-polvere	Nocivo	1, 2, 3
N-Cetil-N,N,N-trimetilammonio bromuro	Nocivo	1, 2, 3
CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetil-ammonio]-1-propansulfonato)	Nocivo	1, 2, 3
Acido Cloridrico	Corrosivo Sprigiona vapori fortemente irritanti	1, 2, 3, 4
Acido p-clorofenossiacetico	Nocivo	1, 2, 3
Cloroformio	Pericoloso per inalazione e contatto, specialmente quando lo si trova in miscela con il Fenolo	1, 2, 3
Cloruro ferrico anidro/idrato tetraidrato/esaidrato	Nocivo Corrosivo	1, 2, 3
Cobalto cloruro	Nocivo	1, 2, 3
Colcemide® (N-deacetil-N-metilcolchicina)	Tossico	1, 2, 3
Colchicina	Molto tossico	1, 2, 3
Rame solfato anidro pentaidrato	Nocivo Pericoloso per l'ambiente Irritante	1, 2, 3 Disporre in modo opportuno dello smaltimento dei rifiuti

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Destomicina A	Irritante	1, 2, 4
Dietil etere	Altamente infiammabile Può formare perossidi esplosivi Ha effetti anestetici	1 Conservare in luogo ben ventilato, lontano da fiamme e scintille. Non fumare. Evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche. Non gettare i rifiuti nelle fognature.
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Sostanza molto instabile e che può auto-decomporsi esplodendo e liberando CO ₂ Sospetto cancerogeno	1, 2, 4 Disporre in modo opportuno dello smaltimento dei rifiuti
Dimetil etere	Altamente volatile Estremamente infiammabile	1 Maneggiare sotto cappa. Conservare in luogo ventilato e a prova d'esplosione.
Dimetilformamide (DMF) e Formamide	Tossico e teratogeno, penetra facilmente attraverso la pelle causando malformazioni negli animali	1, 2, 3 Utilizzare contenitori di vetro o polipropilene, la dimetilformamide scioglie le comuni plastiche. Disporre in modo opportuno dello smaltimento dei rifiuti. Conservare in luogo ventilato ed asciutto.
Dimetil solfato (DMS)	Mutageno -Corrosivo -Cancerogeno	1, 2, 3 Raccogliere i rifiuti in bottiglie contenenti NaOH 5N
Dimetil solfossido (DMSO)	Evitare contatti, penetra attraverso la pelle. Non tossico	1, 2, 3

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
3,5-dimetossi-4-idrossiacetofenone (Acetosiringone)	Irritante per occhi, vie respiratorie e pelle	1, 2, 4
Doxorubicina HCl	Tossico	1, 2, 3
Etidio Bromuro (BET)	Polvere mutagena moderatamente tossica Evitare l'inalazione. Irritante	1, 2 Decontaminare le soluzioni con un ossidante forte
Etilendiammina ferrica (Fe-EDDHA)	Nocivo	1, 2, 3
Acido Etilendiammintetracetico (EDTA)- sale ferrico, sodico e disodico	Irritante	1, 2, 4
Alcol Etilico (etanolo)	Facilmente infiammabile -Irritante -Neurotossico	1
Fenolo	Neurotossico Pericoloso per inalazione e contatto cutaneo (specialmente quando lo si trova in miscela con il cloroformio) Corrosivo	1, 2, 3 Raccogliere i rifiuti in contenitori adatti e disporne lo smaltimento
Fito-ormoni (auxine, citochinine, auxine-simili e citochinine-simili), sintetici o meno	Nocivo	1, 2, 3
Floroglucinolo (1,3,5-Triidrossibenzene)	Irritante	1, 2, 4
Fluoresceina isotiocianato (FITC)	Nocivo	1, 2, 3
Acido 5-Fluoro orotico (5-FOA)	Nocivo	1, 2, 3
5-Fluorouracile	Nocivo	1, 2, 3
Acido Folico (sale di calcio)	Irritante	1, 2, 4
Formaldeide	Molto tossico, Molto irritante, Allergenica (eczema, asma), Mutagenica Se inalata provoca tumori nasali nei ratti	1, 2, 3 Raccogliere i rifiuti e gestirne lo smaltimento in modo opportuno.

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Acido Formico	Corrosivo Tossico È facilmente assorbito dalla pelle	1, 2 Raccogliere i rifiuti per gestirne lo smaltimento. Conservare in luogo fresco, asciutto e ben ventilato
Acido 6-Fosfonogluconico (6-Fosfo-D-gluconato, 6-Pg)	Irritante	1, 2, 4
Giemsa-soluzione (Azure eosin methylene blue)	Infiammabile Tossico	1, 2, 3
Glifosate (N-fosfonom etilglicina)	Irritante	1, 2, 4
Griseofulvin	Nocivo	1, 2, 3
Guanidina idrocloruro	Irritante	1, 2, 4
Guanidina isotiocianato	Nocivo	1, 2, 3
HEPES (N-[2-idrossietil] piperazina-N'-[2-etansulfonico acido])	Irritante	1, 2, 4
Idrazide maleica	Molto tossico	1, 2, 3
Idrazina	Tossico Esplosivo allo stato anidro -Cancerogeno	1, 2 Raccogliere i rifiuti in bottiglie contenenti Ferro cloruro 3M
Acido p-Idrossibenzoico-estere etilico	Irritante	1, 2, 4
8-Idrossichinolone	Nocivo	1, 2, 3
Igromicina B	Molto tossico	1, 2, 3
Iodoacetamide	Pericoloso se inalato	1, 2, 3
Alcol Isoamilico	Pericoloso per inalazione e contatto -Irritante	1, 2
Alcol isopropilico (Isopropanolo)	Esplosivo -Irritante	1, 2
Acido (\pm)Jasmonico (acido [\pm]-1 α ,2 β -3-oxo-2-[<i>cis</i> -2-pentil] ciclopentanacetico)	Irritante	1, 2, 4

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Magnesio cloruro-soluzione	Irritante	1, 2, 4
Acido (DL) Malico	Irritante	1, 2, 4
Manganese solfato	Nocivo	1, 2, 3
Materiale Fotografico	Pericoloso per inalazione, cute e occhi - irritante - allergenico	1, 2, 4
MES (acido 2-(N-Morfolino) etansulfonico)	Irritante	1, 2, 4
Metanolo (alcol metilico)	Infiammabile Tossico per nervo ottico e retina	1, 2, 3
Metotrexate ((+)-Ametopterina)	Molto tossico	1, 2, 3
Metil jasmonato (acido ciclopentan acetico; 3-oxo-(2-pentmetil estere))	Nocivo	1, 2, 3
Mitomicina C	Molto tossico	1, 2, 3
MOPS (acido 4-Morfolino propansulfonico)	Irritante	1, 2, 4
MTT- Tiazol blu (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro)	Nocivo	1, 2, 3
Nicotinamide (vitamina PP)	Irritante	1, 2, 4
Acido Nicotinico (vitamina B)	Irritante	1, 2, 4
Acido Nitrico 65% >65%	Corrosivo Ossidante	1, 2
NP40	È un detergente È opportuno evitare il contatto cutaneo	1, 2
Pectinasi-polvere	Nocivo Evitare il contatto cutaneo e l'inalazione	1, 2, 3
Pectoliasi-polvere	Evitare il contatto cutaneo e l'inalazione	1, 2, 3
PIPES (acido Piperazin-N,N'-bis-2-etansulfonico, acido 1,4-piperazin dietansulfonico)	Irritante	1, 2, 4
Piperidina	Tossico se inalato, irritante	1, 2, 3
Polietilen glicole (PEG, monometil eter mesilato (2.000 e 5.000))	Irritante	1, 2, 4
Pomodoro-polvere	Irritante	1, 2, 4

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Potassio acetato-soluzione	Irritante	1, 2, 4
Potassio carbonato anidro	Nocivo	1, 2, 3
Potassio cloruro-polvere	Irritante	1, 2, 4
Potassio idrossido	Corrosivo	1, 2
Potassio ioduro	Nocivo	1, 2, 3
Potassio nitrato	Ossidante, Irritante	1, 2
Potassio permanganato	Ossidante Nocivo Inquinante ambientale Corrosivo Tossico per inalazione, contatto e ingestione	1, 2, 4. Mantenere lontano dai materiali combustibili.
Proteinasi K-polvere	Nocivo per inalazione. Può provocare sensibilizzazione anche per contatto cutaneo. Irritante per occhi, pelle e sistema respiratorio	1, 2, 3
Putrescina (1,4-diamminobutano diidrocloreuro)	Irritante	1, 2, 4
Ribavirin	Nocivo	1, 2, 3
Acido Salicilico (acido 2-idrossibenzoico)	Nocivo	1, 2, 3
SDS (Sodio dodecil solfato) Sodio lauril solfato	Nocivo Dannoso per inalazione (può causare sensibilizzazioni) e ingestione. Irritante per occhi (può causare gravi danni), sistema respiratorio e pelle.	1, 2, 3, 4. Raccogliere i rifiuti e disporre in modo opportuno per il loro smaltimento. Non respirare la polvere
Sodio carbonato	Irritante per il sistema respiratorio e pelle Causa danni molto seri agli occhi Causa gravi irritazioni	1, 2, 4. Non respirare la polvere
Sodio diidrogeno fosfato	Irritante	1, 2, 4
Sodio idrossido	Corrosivo Si idrata molto facilmente con l'umidità atmosferica A contatto con l'acqua produce reazione esotermica: prestare particolare attenzione quando si preparano le soluzioni, specie se molto concentrate.	1, 2
Sodio nitrato	Ossidante	1, 2
Solfato ferroso	Nocivo	1, 2, 3

COMPOSTO	RISCHIO	PREVENZIONE
Spermidina N(3-amminopropil)- 1,4-diamminobutano	Corrosivo Irritante	1, 2
Tampone Fosfato salino- pH 7,4	Irritante	1, 2, 4
Tampone di Lisi: Tris/ Glucosio/EDTA	Vedi TRIS, EDTA	
Tamponi TE, TAE, TBE:	Vedi TRIS, Ac. Borico, Ac. Acetico glaciale, EDTA	
N,N,N',N'-tetrametilene- tilendiammina (TEMED)	Nocivo per inalazione e ingestione Causa ustioni	1, 2, 4 Non fumare
Timerosal	Molto tossico	1, 2, 3
Acido Tricloroacetico (TCA)	Rischio di irritazioni cutanee, Corrosivo	1, 2
Trietanolammina	Irritante	1, 2, 4
Acido 2,3,5-Triiodobenzoico (TIBA)	Nocivo	1, 2, 3
TRIS (Tris(idrossimetil) amminometano, 2-Ammino- 2-idrossil-metil-1,3-propan- diolo) e TRIS HCl	Irritante	1, 2, 4
Urea	Nocivo per inalazione, contatto cutaneo e ingestione Irritante per occhi, sistema respiratorio e pelle	1, 2, 3 Non respirare la polvere
Xilene	Solvente pericoloso, infiammabile e tossico(anche con manifestazioni a lungo termine) Nocivo per contatto	1, 2, 4 Mantenere, per quanto possibile, in assenza di agenti ossidanti in un'area ventilata
Zinco solfato	Irritante	1, 2, 4

- 1 Usare sotto cappa chimica
- 2 Indossare guanti
- 3 Indossare mascherina
- 4 Indossare occhiali o visiera

Bibliografia

- David J.C. Éléments de sécurité en biologie moléculaire. Flammarion Médecine-Sciences. (1997).
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning - A laboratory manual, 2nd edition. (1989).

ALLEGATO I

Classificazione degli agenti biologici **(Direttiva 2000/54/CE, allegato III)**

1. Gli agenti biologici che non sono stati classificati nei gruppi 2, 3 e 4 dell'elenco non sono implicitamente inseriti nel gruppo 1.
2. Quando un ceppo è attenuato o ha perso geni notoriamente virulenti, il contenimento richiesto dalla classificazione del ceppo parentale non deve necessariamente essere applicato, salvo valutazione appropriata del rischio potenziale da esso rappresentato sul luogo di lavoro.
3. Gli Stati Membri provvedono a che tutti i virus che sono già stati isolati nell'uomo e non sono ancora stati valutati e classificati nel presente allegato, figurino come minimo nel gruppo 2, salvo il caso in cui gli Stati Membri abbiano la prova che non possono provocare malattie nell'uomo.
4. Taluni agenti biologici classificati nel gruppo 3 e indicati con due asterischi nell'elenco allegato, possono costituire per i lavoratori un rischio d'infezione limitato perché normalmente con sono veicolati dall'aria.

Gli Stati Membri valutano le misure di contenimento da applicare a tali agenti biologici tenendo conto della natura delle attività specifiche in questione e della qualità dell'agente biologico interessato, per determinare se in circostanze particolari è possibile rinunciare a talune di queste misure.

BATTERI e organismi simili

NB: Per gli agenti che figurano nel presente elenco la menzione "spp" si riferisce alle altre specie riconosciute patogene per l'uomo.

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Actinobacillus actinomycetemcomitans	2	
Actinomadura madurae	2	
Actinomadura pelletieri	2	
Actinomyces gerenceseriae	2	
Actinomyces israelii	2	
Actinomyces pyogenes	2	
Actinomyces spp.	2	
Arcanobacterium haemolyticum (Corynebacterium haemolyticum)	2	
Bacillus anthracis	3	
Bacteroides fragilis	2	
Bartonella bacilliformis	2	
Bartonella quintana (Rochalimae quintana)	2	
Bartonella (Rochalimea) spp.	2	
Bordetella bronchiseptica	2	
Bordetella parapertussis	2	
Bordetella pertussis	2	V
Borrelia burgdorferi	2	
Borrelia duttonii	2	
Borrelia recurrentis	2	
Borrelia spp.	2	
Brucella abortus	3	
Brucella canis	3	
Brucella melitensis	3	
Brucella suis	3	
Burkholderia mallei (Pseudomonas mallei)	3	
Burkholderia pseudomallei (Pseudomonas pseudomallei)	3	
Campylobacter fetus		
Campylobacter jejuni	2	
Campylobacter spp.	2	
Cardiobacterium hominis	2	
Chlamydia pneumoniae	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Chlamydia trachomatis	2	
Chlamydia psittaci (ceppi aviari)	2	
Chlamydia psittaci (ceppi non aviari)	3	
Clostridium botulinum	2	T
Clostridium perfringens	2	
Clostridium tetani	2	T,V
Clostridium spp.	2	
Corynebacterium diphtheriae	2	T,V
Corynebacterium minutissimum	2	
Corynebacterium pseudotuberculosis	2	
Corynebacterium spp.	2	
Cariella brunetii	2	
Edwardsiella tarda	3	
Ehrlichia sennetsu (Rickettsia sennetsu)	2	
Ehrlichia spp.	2	
Eikenella corrodens	2	
Enterobacter aerogenes/cloacae	2	
Enterobacter spp.	2	
Enterococcus spp.	2	
Erysipelothrix rhusiopathiae	2	
Escherichia coli (ad eccezione dei ceppi non patogeni)	2	T
Escherichia coli, ceppi verocitotossigenici (es. 0157:H7 oppure 013)	3 (**)	
Flavobacterium meningosepticum	2	
Fluoribacter boiemanac (Legionella)	2	
Francisella tularensis (tipo A)	3	
Francisella tularensis (tipo B)	2	
Fusobacterium necrophorum	2	
Gardnerella vaginalis	2	
Haemophilus ducreyi	2	
Haemophilus influenzae	2	
Haemophilus spp.	2	
Helicobacter pylori	2	
Klebsiella axytoca	2	
Klebsiella pneumoniae	2	
Klebsiella spp.	2	
Legionella pneumophila	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Legionella spp.	2	
Leptospira interrogans (tutti i serotipi)	2	
Listeria monocytogenes	2	
Listeria ivanovii	2	
Morganella morganii	2	
Mycobacterium africanum	3	V
Mycobacterium avium/intracellulare	2	
Mycobacterium bovis (ad eccezione del ceppo BCG)	3	V
Mycobacterium chelonae	2	
Mycobacterium fortuitum	2	
Mycobacterium kansasii	2	
Mycobacterium leprae	3	
Mycobacterium malmoense	2	
Mycobacterium marinum	2	
Mycobacterium microti	3 (**)	
Mycobacterium paratuberculosis	2	
Mycobacterium scrofulaceum	2	
Mycobacterium simiae	2	
Mycobacterium szulgai	2	
Mycobacterium tuberculosis	3	V
Mycobacterium ulcerans	3 (**)	
Mycobacterium xenopi	2	
Mycoplasma caviae	2	
Mycoplasma hominis	2	
Mycoplasma pneumoniae	2	
Neisseria gonorrhoeae	2	
Neisseria meningitidis	2	V
Nocardia asteroides	2	
Nocardia brasiliensis	2	
Nocardia farcinica	2	
Nocardia nova	2	
Nocardia otitidiscaviarum	2	
Pasteurella multocida	2	
Pasteurella spp.	2	
Peptostreptococcus anaerobius	2	
Plesiomonas shigelloides	2	
Porphyromonas spp.	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Prevotella spp.	2	
Proteus mirabilis	2	
Proteus penneri	2	
Proteus vulgaris	2	
Providencia alcalifaciens	2	
Providencia retigeri	2	
Providencia spp.	2	
Pseudomonas aeruginosa	2	
Rhodococcus equi	2	
Rickettsia akari	3 (**)	
Rickettsia canada	3 (**)	
Rickettsia conorii	3	
Rickettsia montana	3 (**)	
Rickettsia typhi (Rickettsia mooseri)	3	
Rickettsia prowazekii	3	
Rickettsia rickettsii	3	
Rickettsia tsutsugamushi	3	
Rickettsia spp.	2	
Salmonella arizonae	2	
Salmonella enteritidis	2	
Salmonella typhimurium	2	
Salmonella paratyphi A, B, C	2	V
Salmonella typhi	3 (**)	V
Salmonella (altre varietà serologiche)	2	
Serpulina spp.	2	
Shigella boydii	2	
Shigella dysenteriae (tipo 1)	3 (**)	T
Shigella dysenteriae (diverso dal tipo 1)	2	
Shigella flexneri	2	
Shigella sonnei	2	
Staphylococcus aureus	2	
Streptobacillus moniliformis	2	
Streptococcus pneumoniae	2	
Streptococcus pyogenes	2	
Streptococcus suis	2	
Streptococcus spp.	2	
Treponema carateum	2	
Treponema pallidum	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Treponema pertenuae	2	
Treponema spp.	2	
Vibrio cholerae (incluso El Tor)	2	
Vibrio parahaemolyticus	2	
Vibrio spp.	2	
Yersinia enterocolitica	2	
Yersinia pestis	3	V
Yersinia pseudotuberculosis	2	
Yersinia spp.	2	

VIRUS (*)

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Adenoviridae	2	
Arenaviridae		
LCM-virus complex (Arenavirus del Vecchio mondo):		
Virus Lassa	4	
Virus della coriomeningite linfocitaria (ceppi neutrotopi)	3	
Virus della coriomeningite linfocitaria (altri ceppi)	2	
Virus Mopeia	2	
Altri LCM-Lassa virus complex	2	
Virus complex Tacaribe (Arenavirus del Nuovo mondo):		
Virus Guanarito	4	
Virus Junin	4	
Virus Sabia	4	
Virus Machupo	4	
Virus Flexal	3	
Altri virus complex Tacaribe	2	
Astroviridae	2	
Bunyaviridae		
Belgrado (noto anche come Dobrava)	3	
Bhanja	2	
Virus Bunyamwera	2	
Germiston	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Virus Oropouche	3	
Sin Numbre (ex Muerto Canyon)	3	
Virus dell'encefalite californiana	2	
Hantavirus:		
Hantaan (febbre emorragica coreana)	3	
Seoul virus	3	
Puumala virus	2	
Prospect Hill virus	2	
Altri hantavirus	2	
Nairovirus:		
Virus della febbre emorragica di		
Crimea/Congo	4	
Virus Hazara	2	
Phlebovirus:		
Febbre della Valle del Rift	3	V
Febbre a flebotomi (Sandfly fever)	2	
Virus Toscana	2	
Altri Bunyavirus noti come patogeni	2	
Caliciviridae		
Virus dell'epatite E	3 (**)	
Norwalk Virus	2	
Altri Caliciviridae	2	
Coronaviridae		
Filoviridae		
Virus Ebola	4	
Virus di Marburgo	4	
Flaviviridae		
Encefalite d'Australia (encefalite della		
Vallede Murray)	3	
Virus dell'encefalite da zecca dell'Europa		
centrale	3 (**)	V
Absettarov	3	
Hanzalova	3	
Hypr	3	
Kumlinge	3	
Virus della Dengue tipo 1-4	3	
Virus dell'epatite C	3 (**)	D
Virus dell'epatite G	3 (**)	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Encefalite B giapponese	3	V
Foresta di Kyasanur	3 V	
Louping ill	3 (**)	
Omsk (a)	3	V
Powassan	3	
Rocio	3	
Encefalite verno-estiva russa (a)	3	V
Encefalite di St. Louis	3	
Virus Wesselsbron	3 (**)	
Virus della Valle del Nilo	3	
Febbre gialla	3	V
Altri flavivirus noti per essere patogeni	2	
Hepadnaviridae		
Virus dell'epatite B	3 (**)	V,D
Virus dell'epatite D (Delta) (b)	3 (**)	V,D
Herpesviridae		
Cytomegalovirus	2	
Virus dell' Epstein-Barr	2	
Herpesvirus simiae (B virus)	3	
Herpes simplex virus tipi 1 e 2	2	
Herpesvirus varicella-zoster	2	
Virus linfotropo B dell'uomo (HBLV-HHV6)	2	
Virus herpes dell'uomo tipo 7	2	
Virus herpes dell'uomo tipo 8	2	D
Orthomyxoviridae		
Virus influenza tipi A, B e C	2	V (c)
Orthomyxoviridae trasmesse dalle zecche: Dhori & Thogoto	2	
Papovaviridae		
Virus BK e JC	2	D (d)
Papillomavirus dell'uomo	2	D (d)
Paramyxoviridae		
Virus del morbillo	2	V
Virus degli orecchioni	2	V
Virus della malattia di Newcastle	2	
Virus parainfluenzale tipi 1-4	2	
Virus respiratorio sinciziale	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Parvoviridae		
Parvovirus dell'uomo (B 19)	2	
Picornaviridae		
Virus della congiuntivite emorragica (AHC)	2	
Virus Coxsackie	2	
Virus Echo	2	
Virus dell'epatite A (enterovirus dell'uomo tipo 72)	2	V
Virus della poliomelite	2	V
Rhinovirus	2	
Poxviridae		
Buffalopox virus (e)	2	
Cowpox virus	2	
Elephantpox virus (f)	2	
Virus del nodulo dei mungitori	2	
Molluscum contagiosum virus	2	
Monkeypox virus	3	V
Orf virus	2	
Rabbitpox virus (g)	2	
Vaccinia virus	2	
Variola (major & minor) virus	4	V
White pox virus ("Variola virus")	4	V
Yatapox virus (Tana & Yaba)	2	
Reoviridae		
Coltivirus	2	
Rotavirus umano	2	
Orbivirus	2	
Reovirus	2	
Retroviridae (h)		
Virus della sindrome di immunodeficienza umana	3 (**)	D
Virus delle (AIDS) leucemie umane e cellule T (HTLV) tipi 1 e 2	3 (**)	D
SIV (h)	3 (**)	
Rhabdoviridae		
Virus della rabbia	3 (**)	V
Virus della stomatite vescicolosa	2	
Togaviridae		

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Alphavirus:		
Encefalomielite equina dell'America dell'est	3	V
Virus Bebaru	2	
Virus Chikungunya	3 (**)	
Virus Everglades	3 (**)	
Virus Mayaro	3	
Virus Mucambo	3 (**)	
Virus Ndumu	3	
Virus O'nyong-nyong	2	
Virus del Fiume Ross	2	
Virus della Foresta di Semliki	2	
Virus Sindbis	2	
Virus Tonate	3 (**)	
Encefalomielite equina del Venezuela	3	V
Encefalomielite equina dell'America dell'ovest	3	V
Altri alphavirus noti	2	
Rubivirus (rubella)	2	V
Toroviridae	2	
Virus non classificati:		
Moribillivirus equino	4	
Virus dell'epatite non ancora identificati	3 (**)	D
Agenti non classici associati con le encefaliti spongiformi trasmissibili (TSE):		
Malattia di Creutzfeldt Jakob	3 (**)	D (d)
Variante del morbo di Creutzfeldt Jakob	3 (**)	D (d)
Encefalite spongiforme bovina (BSE) ed altre TSE degli animali a questa associate (i)	3 (**)	D (d)
Sindrome di Gerstmann		
Gerstmann-Sträussler-Scheinker	3 (**)	D (d)
Kuru	3 (**)	D (d)

PARASSITI

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Acanthamoeba castellanii	2	
Ancylostoma duodenale	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Angiostrongylus cantonensis	2	
Angiostrongylus costaricensis	2	
Ascaris lumbricoides	2	A
Ascaris suum	2	A
Babesia divergens	2	
Babesia microti	2	
Balantidium coli	2	
Brugia malayi	2	
Brugia pahangi	2	
Capillaria philippinensis	2	
Capillaria spp.	2	
Clonorchis sinensis	2	
Clonorchis viverrini	2	
Cryptosporidium parvum	2	
Cryptosporidium spp.	2	
Cyclospora cayetanensis	2	
Dipetalonema streptocerca	2	
Diphyllobothrium latum	2	
Dracunculus medinensis	2	
Echinococcus granulosus	3 (**)	
Echinococcus multilocularis	3 (**)	
Echinococcus vogeli	3 (**)	
Entamoeba histolytica	2	
Fasciola gigantica	2	
Fasciola hepatica	2	
Fasciolopsis buski	2	
Giardia lamblia (Giardia intestinalis)	2	
Hymenolepis diminuta	2	
Hymenolepis nana	2	
Leishmania brasiliensis	3 (**)	
Leishmania donovani	3 (**)	
Leishmania ethiopia	2	
Leishmania mexicana	2	
Leishmania peruviana	2	
Leishmania tropica	2	
Leishmania major	2	
Leishmania spp.	2	
Lea lea	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Mansonella ozzardi	2	
Mansonella persians	2	
Naegleria fowleri	3	
Necator americanus	2	
Onchocerca volvulus	2	
Opisthorchis felineus	2	
Opisthorchis spp.	2	
Paragonimus westermani	2	
Plasmodium falciparum	3 (**)	
Plasmodium spp. (uomo e scimmia)	2	
Sarcocystis suihominis	2	
Schistosoma haematobium	2	
Schistosoma intercalatum	2	
Schistosoma japonicum	2	
Schistosoma mansoni	2	
Schistosoma mekongi	2	
Strongyloides stercoralis	2	
Strongyloides spp.	2	
Taenia saginata	2	
Taenia solium	2	
Toxocara canis	3 (**)	
Toxoplasma gondii	2	
Trichinella spiralis	2	
Trichuris trichiura	2	
Trypanosoma brucei brucei	2	
Trypanosoma brucei gambiense	2	
Trypanosoma brucei rhodesiense	3 (**)	
Trypanosoma cruzi	3	
Wuchereria bancrofti	2	

FUNGHI

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Aspergillus fumigatus	2	A
Blastomyces dermatitidis (Ajellomyces dermatitidis)	3	
Candida albicans	2	A
Candida tropicalis	2	

Agente biologico	Classificazione	Rilievi
Cladophilophora bantiana (anticamente: xylophypha bantiana, cladosporium bantianum o trichoides)	3	
Coccidioides immunitis	3	A
Cryptococcus neoformans var. neofonnans (Filobasidiella neofonnans var neoformans)	2	A
Cryptococcus neoformans var. gattii (Filobasidiella bacillispora)	2	A
Emmonsia parva var. parva	2	
Emmonsia parva var. crescens	2	
Epidermophyton floccosum	2	A
Fonsecaea compacta	2	
Fonsecaea pedrosoi	2	
Histoplasma capsulatum var. capsulatum (Ajellomyces capsulatus)	3	
Histoplasma capsulatum duboisii	3	
Madurella grisea	2	
Microsporium spp.	2	A
Neotestudina rosatii	2	
Paracoccidioides brasiliensis	3	
Penicillium marneffeii	2	A
Scedosporium apiospennum (Pseudallescheria boydii)	2	
Scedosporium prolificans (inflatum)	2	
Sporothrix schenckii	2	
Trichophyton rubrum	2	
Trichophyton spp.	2	

(*) C.f.r. Introduzione punto 3

(**) C.f.r. introduzione punto 4

(a) Encefalite trasmessa dalle zecche

(b) Il virus dell'epatite D esercita il suo potere patogeno nel lavoratore soltanto in casi di infezione simultanea o secondaria rispetto a quella provocata dal virus dell'epatite B. La vaccinazione contro il virus dell'epatite B protegge pertanto i lavoratori non affetti dal virus dell'epatite B contro il virus dell'epatite D (Delta).

(c) Soltanto i tipi A e B.

- (d) Raccomandato per i lavoratori che comportano un contatto diretto con questi agenti.
- (e) Alla rubrica possono essere identificati due virus, un genere “buffalopox” e una variante del virus “vaccinia”.
- (f) Variante del Cowpox.
- (g) Variante di Vaccinia.
- (h) Non esiste attualmente alcuna prova di infezione dell’uomo provocata da altri retrovirus di origine scimmiesca. A titolo di precauzione si raccomanda un contenimento di livello 3 per i lavoratori che comportano un’esposizione a tali retrovirus.
- (i) Non esiste attualmente alcuna prova di infezione dell’uomo provocata dagli agenti responsabili di altri TSE degli animali. Tuttavia, a titolo precauzionale, si consiglia di applicare nei laboratori, il livello di contenimento 3 (**), ad eccezione dei lavori relativi ad un agente identificato di “scrapie” per cui un livello di contenimento 2 è sufficiente.

A: Possibili effetti allergici.

D: L’elenco dei lavoratori esposti all’agente biologico deve essere conservato per di più di dieci anni dalla fine dell’ultima esposizione nota.

T: Produzione di tossine.

V: Vaccino efficace disponibile.

ALLEGATO II

LEGISLAZIONE EUROPEA

SICUREZZA SUL LAVORO

Direttiva 82/605/CEE sulla protezione dei lavoratori contro i rischi connessi ad un'esposizione al piombo metallico ed ai suoi composti ionici durante il lavoro (prima direttiva particolare ai sensi dell' articolo 8 della direttiva 80/1107/CEE).

Direttiva del Consiglio 83/477/CEE sulla protezione dei lavoratori contro i rischi connessi con un'esposizione all'amianto durante il lavoro (seconda direttiva particolare ai sensi dell'articolo 8 della direttiva 80/1107/CEE).

Direttiva del Consiglio 86/188/CEE in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione al rumore durante il lavoro.

Direttiva del Consiglio 89/391/CEE concernente l'attuazione di misure volte a promuovere il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori durante il lavoro.

Direttiva del Consiglio 89/654/CEE relativa alle prescrizioni minime di sicurezza e di salute per i luoghi di lavoro (prima direttiva particolare ai sensi dell' articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva del Consiglio 89/655/CEE relativa ai requisiti minimi di sicurezza e di salute per l'uso delle attrezzature di lavoro da parte dei lavoratori durante il lavoro (seconda direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva del Consiglio 95/63/CE del 5 dicembre 1995 che modifica la direttiva 89/655/CEE relativa ai requisiti minimi di sicurezza e di salute per l'uso delle attrezzature di lavoro da parte dei lavoratori durante il lavoro (seconda direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

SEGNALETICA DI SICUREZZA

Direttiva 92/58/CEE recante le prescrizioni minime per la segnaletica di sicurezza e/o di salute sul luogo di lavoro (nona direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE

Direttiva del Consiglio 89/656/CEE relativa alle prescrizioni minime in materia di sicurezza e salute per l'uso da parte dei lavoratori di attrezzature di protezione individuale durante il lavoro (D.P.I.) (terza direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva del Consiglio 89/686/CEE concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative ai dispositivi di protezione individuale.

BUONA PRATICA DI LABORATORIO

Direttiva del consiglio 88/320/CEE concernente l'ispezione e la verifica della buona pratica di laboratorio (BPL).

Direttiva della commissione 90/18/CEE del 18 dicembre 1989, che adatta al progresso tecnico l'allegato della direttiva 88/320/CEE del Consiglio concernente l'ispezione e la verifica della buona prassi di laboratorio (BPL).

Direttiva della Commissione 99/11/CE che adegua al progresso tecnico i principi di buona pratica di laboratorio di cui alla direttiva 87/18/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative all'applicazione dei principi di buona pratica di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche.

Direttiva della Commissione 99/12/CE che adegua al progresso tecnico per la seconda volta l'allegato della direttiva 88/320/CEE del Consiglio concernente l'ispezione e la verifica della buona prassi di laboratorio (BPL).

SOSTANZE PERICOLOSE

Direttiva del Consiglio 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose.

Direttiva della Commissione 76/907/CEE recante adeguamento al progresso tecnico della direttiva del Consiglio del 27 giugno 1967 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose.

Direttiva del Consiglio 79/831/CEE recante la sesta modifica della direttiva 67/548/CEE.

Direttiva del Consiglio 80/1107/CEE sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro.

Direttiva del Consiglio 88/642/CEE che modifica la direttiva 80/1107/CEE del Consiglio sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici sul luogo di lavoro.

Direttiva del Consiglio 90/394/CEE sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni durante il lavoro (setta direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva della Commissione 91/322/CEE relativa alla fissazione di valori limite indicativi in applicazione della direttiva 80/1107/CEE del Consiglio sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici sul luogo di lavoro.

Direttiva del Consiglio 92/32/CEE che modifica per la settima volta la direttiva 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose.

Direttiva della Commissione 96/94/CE che fissa un secondo elenco di valori limite indicativi in applicazione della direttiva 80/1107/CEE.

Direttiva del Consiglio 97/42/CE che modifica per la prima volta la direttiva 90/394/CEE.

Direttiva del Consiglio 98/24/CE sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro (quattordicesima direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1, della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva del Consiglio 99/38/CE che modifica per la seconda volta la direttiva 90/394/CEE.

Direttiva della Commissione 2000/39/CE relativa alla messa a punto di un primo elenco di valori limite indicativi in applicazione della direttiva 98/24/CE del Consiglio sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti chimici sul luogo di lavoro.

AGENTI BIOLOGICI

Direttiva del Consiglio 90/679/CEE del 26 novembre 1990 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro (settima direttiva particolare ai sensi dell' art. 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva del Consiglio 93/88/CEE del 12 ottobre 1993 che modifica la direttiva 90/679/CEE relativa alla protezione dei lavoratori contro rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro (settima direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva della commissione 95/30/CE del 30 giugno 1995, al progresso tecnico della direttiva 90/679/CEE del consiglio relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

Direttiva della Commissione 97/59/CE, che adatta al progresso tecnico la direttiva 90/679/CEE del Consiglio relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro (settima direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE).

Direttiva della Commissione 97/65/CE, del 26 novembre 1997 recante terzo adattamento al progresso tecnico della direttiva 90/679/CEE del Consiglio relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

Direttiva della Commissione 2000/54/CE, del 18 settembre 2000 relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

IMPIEGO CONFINATO DI MOGM

Direttiva del Consiglio 90/219/CEE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decisione della Commissione 91/448/CEE del 29 luglio 1991 concernente orientamenti per la classificazione di cui all'articolo 4 della direttiva 90/219/CEE.

Direttiva della Commissione 94/51/CEE del 7 novembre 1994, recante adeguamento al progresso tecnico della direttiva 90/219/CEE del consiglio sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decisione della Commissione 96/134/CE che modifica la decisione 91/448/CEE concernente orientamenti per la classificazione di cui all'articolo 4 della direttiva 90/219/CEE del Consiglio sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Direttiva del Consiglio 98/81/CE del 26 ottobre 1998, che modifica la direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decisione della Commissione 2000/608/CE del 27 settembre 2000, che mo-

difica la direttiva 90/219/CEE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decisione del consiglio 2001/204/CE dell' 8 marzo 2001, che integra la direttiva 90/219/CEE relativamente ai criteri per stabilire la sicurezza per la salute umana e per l'ambiente di alcuni tipi di microrganismi geneticamente modificati.

RADIOPROTEZIONE

Direttive del Consiglio 59/221/CEE che fissano le norme fondamentali relative alla protezione sanitaria della popolazione e dei lavoratori contro i pericoli derivanti dalle radiazioni ionizzanti.

Direttiva del Consiglio 80/836/EURATOM che modifica le direttive che fissano le norme fondamentali relative alla protezione sanitaria della popolazione e dei lavoratori contro i pericoli derivanti dalle radiazioni ionizzanti.

Direttiva del Consiglio 84/466/EURATOM che stabilisce le misure fondamentali relative alla protezione radiologica delle persone sottoposte ad esami e a trattamenti medici.

Direttiva del Consiglio 84/467/EURATOM che modifica la direttiva 80/836/EURATOM.

Direttiva del Consiglio 89/618/EURATOM concernente l'informazione della popolazione sui provvedimenti di protezione sanitaria applicabili e sul comportamento da adottare in caso di emergenza radioattiva.

Direttiva del Consiglio 90/641/EURATOM concernente la protezione operativa dei lavoratori esterni esposti al rischio di radiazioni ionizzanti nel corso del loro intervento in zona controllata.

Direttiva del Consiglio 92/3/EURATOM relativa alla sorveglianza ed al controllo delle spedizioni di residui radioattivi tra Stati membri e di quelle verso la Comunità e fuori da essa.

TRASPORTO

Direttiva del Consiglio 92/118/CEE concernente condizioni sanitarie per gli scambi e le importazioni dei patogeni e dei prodotti non soggetti a normative comunitarie specifiche.

Direttiva del consiglio 93/75/CEE relativa alle condizioni minime necessarie per le navi dirette a porti marittimi della Comunità o che ne escono e che trasportano merci pericolose o inquinanti.

Direttiva del Consiglio 94/55/CEE concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative al trasporto di merci pericolose su strada.

Direttiva del consiglio 96/35/CE relativa alla designazione e alla qualificazione professionale dei consulenti per la sicurezza dei trasporti su strada, per ferrovia o per via navigabile di merci pericolose.

Direttiva della commissione 96/39/CE relativa alle condizioni minime necessarie per le navi dirette ai porti marittimi della Comunità o che ne escono e che trasportano merci pericolose o inquinanti.

Direttiva del consiglio 96/49/CE relativa al trasporto di merci pericolose per ferrovia.

Direttiva della Commissione 96/86/CE che adegua al progresso tecnico la direttiva 94/55/CEE del consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative al trasporto di merci pericolose su strada (Testo rilevante ai fini del SEE).

Direttiva della commissione 96/87/CE che adegua al progresso tecnico la direttiva 96/49/CE.

Direttiva della commissione 97/34/CE del 6 giugno 1997 che modifica la direttiva del consiglio 93/75/CEE riguardante i requisiti minimi per le navi.

Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio 2000/61/CE che modifica la direttiva 94/55/CE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative al trasporto di merci pericolose su strada.

RIFIUTI

Direttiva del Consiglio 75/442/CEE relativa ai rifiuti.

Direttiva del Consiglio 76/403/CEE relativa allo smaltimento dei policlorodifenili e dei policlorotrifenili.

Direttiva del Consiglio 78/319/CEE relativa ai rifiuti tossici e nocivi.

Direttiva del Consiglio 91/156/CEE sui rifiuti.

Direttiva del Consiglio 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi.

Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio 94/62/CEE sugli imballaggi e sui rifiuti da imballaggio.

ANIMALI

Direttiva 86/609/CEE del Consiglio del 24 novembre 1986 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative

degli Stati Membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

Decisione del Consiglio 1999/575/CE, del 23 marzo 1998, relativa alla conclusione da parte della comunità della convenzione europea per la protezione degli animali vertebrati utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.

LEGISLAZIONE ITALIANA

SICUREZZA SUL LAVORO

DPR 547 del 27 aprile 1955, Norme generali per la prevenzione degli infortuni.

Decreto Legislativo 277 del 15 agosto 1991, attuazione delle direttive 80/1107/CEE, 82/605/CEE, 83/477/CEE, 86/188/CEE e 88/642/CEE in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti chimici, fisici e biologici durante il lavoro, a norma dell'art.7 della legge 212/90.

Decreto Legislativo 120 del 27 gennaio 1992, attuazione delle direttive 88/320/CEE e 90/18/CEE in materia di ispezione e verifica della buona pratica di laboratorio.

Decreto Legislativo 626/94, attuazione delle direttive riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori durante il lavoro.

Decreto Legislativo 242 del 19 marzo 1996, riguardante modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 626 del 19 settembre 1994, recante attuazione di direttive comunitarie riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro.

D.M. del 5 agosto 1999, disposizioni relative all'ispezione e verifica della buona prassi di laboratorio in recepimento delle direttive 1999/11/CE e 1999/12/CE.

Decreto del 12 novembre 1999 del Ministero del lavoro e prevenzione sociale che modifica l'allegato XI del decreto legislativo 242 del 19/3/96, concernente modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 626 del 19 settembre 1994, recante attuazione di direttive comunitarie riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro.

Decreto Legislativo 66 del 25 febbraio 2000, attuazione delle direttive 97/42/CE e 99/38/CE in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro.

SEGNALETICA DI SICUREZZA

Decreto Legislativo 493 del 14 agosto 1996, attuazione della direttiva 92/58/CEE concernente le prescrizioni minime per la segnaletica di sicurezza e/o di salute sul luogo di lavoro.

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALE

DPR 303 del 19 marzo 1956, prevenzione degli infortuni sul lavoro e igiene, norme generali per l'igiene del lavoro.

Decreto Legislativo 475 del 4 dicembre 1992, attuazione della direttiva 89/686/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1989 in materia di ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative ai dispositivi di protezione individuale.

Decreto Ministeriale del 22 marzo 1993, determinazione dei requisiti che devono essere posseduti dagli organismi di controllo dei dispositivi di protezione individuale.

Decreto del 2 maggio 2001, criteri per l'individuazione e l'uso dei Dispositivi di Protezione Individuale.

SMALTIMENTO RIFIUTI

DPR 915 del 10 settembre 1982, attuazione direttive 75/442/CEE relativa ai rifiuti, 76/403/CEE relativa allo smaltimento dei policlorodifenili e dei policlorotrifenili e 78/319/CEE relativa ai rifiuti tossici e nocivi.

Decreto Legislativo 22 del 5 febbraio 1997, attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CEE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio.

Decreto Legislativo 389 del 8 novembre 1997, modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 22 del 5 febbraio 1997, in materia di rifiuti, di rifiuti pericolosi, di imballaggi e di rifiuti di imballaggio.

Decreto Ministeriale 148 dell'1 aprile 1998, (Ministero dell'Ambiente) regolamento recante approvazione del modello dei registri di carico e scarico dei rifiuti ai sensi degli articoli 12, 18, comma 2 (lettera m), e 18, comma 4, del decreto legislativo 22 del 5 febbraio 1997.

Decreto Legislativo 372 del 4 agosto 1998, regolamento recante norme sulla riorganizzazione del catasto dei rifiuti.

Circolare Ministeriale GAB/DEC/812/98 del 2 agosto 1998, (Ministero dell'Ambiente e Ministero dell'Industria del Commercio e dell'Artigianato) circolare esplicativa sulla compilazione dei registri di carico e scarico dei rifiuti e dei formulari di accompagnamento dei rifiuti trasportati individuati, rispettivamente, dal decreto ministeriale 1° aprile 1998, n. 145, e dal decreto ministeriale 148 del 1 aprile 1998.

Decreto Legislativo 426 del 9 dicembre 1998, nuovi interventi in campo ambientale.

SOSTANZE PERICOLOSE

(classificazione, imballaggio ed etichettatura)

Legge ordinaria del Parlamento 256 del 29 maggio 1974, classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi.

Decreto del Ministero della Sanità del 17 dicembre 1977, classificazione e disciplina dell'imballaggio e della etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione della Comunità economica europea.

Decreto del Presidente della Repubblica 927 del 24 novembre 1981, recepimento della direttiva del Consiglio delle Comunità europee 79/831/CEE del 18 settembre 1979, recante la sesta modifica della direttiva 67/548/CEE, relativa alla classificazione, imballaggio ed alla etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi.

Circolare 21 del Ministero della Sanità del 24 marzo 1982, norme per l'attuazione dell'inventario CEE delle sostanze chimiche esistenti.

Decreto Ministeriale 84 del 23 febbraio 1988, etichettatura speciale da applicare su sostanze e preparati pericolosi.

Decreto Ministeriale del 28 gennaio 1992 (Ministero della Sanità), classificazione e disciplina dell'imballaggio e della etichettatura dei preparati pericolosi in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione della Comunità Europea.

Decreto Ministeriale del 16 febbraio 1993 (Ministero della Sanità), modificazioni ed integrazioni ai decreti ministeriali 3 dicembre 1985 e 20 dicembre 1989 sulla classificazione e la disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità europee.

Decreto Legislativo 52 del 3 febbraio 1997, attuazione della direttiva 92/32/CEE concernente classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose.

Decreto Legislativo 28 del 516 luglio 1998, attuazione di direttive comunitarie in materia di classificazione, imballaggio ed etichettatura dei preparati pericolosi, a norma dell'articolo 38 della legge 128 del 24 aprile 1998.

Decreto Legislativo 66 del 25 febbraio 2000, attuazione delle direttive 97/42/CE e 99/38/CE in materia di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro.

RADIOPROTEZIONE

Decreto del Presidente della Repubblica 185 del 13 febbraio 1964, sicurezza degli impianti e protezione sanitaria dei lavoratori e delle popolazioni contro i pericoli delle radiazioni ionizzanti derivanti dall'impiego pacifico dell'energia nucleare.

Decreto Presidente della Repubblica 1704 del 30 dicembre 1965 modifiche ed integrazioni alla Legge 1860 del 31 dicembre 1962, sull'impiego pacifico dell'energia nucleare (G. U. 9/5/66, n. 112).

Decreto Legislativo del Governo 230 del 17 marzo 1995 attuazione delle direttive Euratom 80/836, 84/467, 84/466, 89/618, 90/641 e 92/3 in materia di radiazioni ionizzanti.

Decreti applicativi, che hanno modificato in parte il decreto legislativo 230 del 17/3/95:

- **D.M. del 6 marzo 1998:** con cui sono stabilite le procedure per l'inoltro delle istanze di deroga ai divieti di cui al presente articolo.
- **D.M. del 21 novembre 1997:** definizione delle procedure per l'inoltro delle richieste di approvazione di programmi di ricerca clinica comportanti l'esposizione di persone a radiazioni ionizzanti.
- **D.M. del 21 febbraio 1997:** titoli di studio e qualificazioni professionali richieste per l'esercizio professionale della radiodiagnostica, della radioterapia, della medicina nucleare nonché per le attività diagnostiche complementari all'esercizio clinico e per quelle di competenza del fisico specialista.
- **D.M. del 21 febbraio 1997:** linee guida per l'accertamento e l'acquisizione delle conoscenze radioprotezionistiche per il personale medico che svolge attività specialistica di radiodiagnostica, di radioterapia e di medicina nucleare nonché attività radiodiagnostica complementare all'esercizio clinico ivi compresa quella in campo odontoiatrico.
- **D.M. del 21 febbraio 1997:** modalità per l'acquisizione di adeguate conoscenze radioprotezionistiche nell'ambito dei corsi di laurea in medicina e chirurgia e in odontoiatria e protesi dentaria nonché dei corsi di specializzazione in radiodiagnostica, radioterapia e medicina nucleare.
- **D.M. del 14 febbraio 1997:** determinazione delle modalità affinché i documenti radiologici e di medicina nucleare e i resoconti esistenti siano resi tempestivamente disponibili per successive esigenze mediche, ai sensi dell'art. 111, comma 10, del decreto legislativo 230 del 17 marzo 1995.
- **D.M. del 14 febbraio 1997:** individuazione degli impianti complessi di radioterapia e di medicina nucleare, ai sensi dell'art. 111, comma 11, del decreto legislativo 230 del 17 marzo 1995.

- **D.M. del 14 febbraio 1997:** determinazione dei criteri minimi di accettabilità delle apparecchiature radiologiche ad uso medico ed odontoiatrico nonché di quelle di medicina nucleare, ai sensi dell'art. 112, comma 3, del decreto legislativo 230 del 17 marzo 1995.
- **D.M. del 14 febbraio 1997:** determinazione del tipo, modalità e periodicità del controllo di qualità da parte del fisico specialista o dell'esperto qualificato delle apparecchiature radiologiche e di medicina nucleare, ai sensi dell'art. 113, comma 2, del decreto legislativo 230 del 17 marzo 1995.

IMPIEGO CONFINATO DI MOGM

Decreto Legislativo 91 del 3 marzo 1993, attuazione della direttiva 90/219/CEE concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decreto del 20 maggio 1993, tariffe e modalità relative alle prestazioni fornite dal Ministero della Sanità in applicazione dell'art. 19 del decreto legislativo 91 del 3 marzo 1993, che attua la direttiva 90/219/CEE in materia di impiego confinato dei microrganismi geneticamente modificati.

Decreto del 1 marzo 1995 in G.U. 16/5/95 n. 112, attuazione della direttiva 94/51.

Decreto del 25 settembre 1996, disposizioni aggiuntive sulle modalità di versamento dei diritti relativi alle prestazioni fornite dal Ministero della Sanità in applicazione dell'art. 19 del decreto legislativo 91 del 3 marzo 1993, disciplinate dal decreto del Ministro della sanità 20/5/1993.

Decreto del 10 aprile 1997, aggiornamento delle disposizioni aggiuntive sulle modalità di versamento dei diritti relativi alle prestazioni fornite dal Ministero, in applicazione dell'art. 19 del decreto legislativo 91 del 3 marzo 1993, disciplinate dal decreto ministeriale 20/5/93.

Decreto Legislativo 206 del 12 aprile 2001, attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

Decreto del 2 maggio 2001, tariffe relative alle notifiche per l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati.

TRASPORTO

Circolare ministeriale 16 del 20 luglio 1994.

D.M. del 4 settembre 1996 recepimento della direttiva 94/55/CEE concer-

nente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative al trasporto di merci pericolose su strada.

Decreto Legislativo 674 del 13 dicembre 1996 in G.U. 7/1/97 n. 4, attuazione della direttiva 92/118/CEE concernente condizioni sanitarie per gli scambi e le importazioni dei patogeni e dei prodotti non soggetti a normative comunitarie specifiche.

D.M. del 15 maggio 1997, recepimento della 96/86/CEE che adegua al progresso tecnico la direttiva 94/55/CEE del consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri relative al trasporto di merci pericolose su strada (testo rilevante ai fini del SEE).

D. P. R. 268 del 19 maggio 1997, recepimento delle direttive europee 93/75/CEE relativa alle condizioni minime necessarie per le navi dirette a porti marittimi della Comunità o che ne escono e che trasportano merci pericolose o inquinanti e 96/39/CE relativa alle condizioni minime necessarie per le navi dirette ai porti marittimi della Comunità o che ne escono e che trasportano merci pericolose o inquinanti.

Decreto del 14 ottobre 1998, del Ministero dei trasporti e della navigazione, attuazione della direttiva europea 97/34/CE del 6 giugno 1997 che modifica la direttiva del consiglio 93/75/CEE riguardante i requisiti minimi per le navi.

Decreto legislativo 41 del 13 gennaio 1999, attuazione delle direttive europee 96/49/CE relativa al trasporto di merci pericolose per ferrovia e 96/87/CE che adegua al progresso tecnico la direttiva 96/49/CE.

Decreto legislativo 40 del 4 febbraio 2000, attuazione della direttiva europea 96/35/CE relativa alla designazione e alla qualificazione professionale dei consulenti per la sicurezza dei trasporti su strada, per ferrovia o per via navigabile di merci pericolose.

Decreto del 3 maggio 2001, recepimento della direttiva 2000/61/CE che modifica la direttiva 94/55/CE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative al trasporto di merci pericolose su strada.

SPERIMENTAZIONI SU ANIMALI

Decreto Legislativo 116 del 27 gennaio 1992, attuazione della direttiva 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Pubblicato nel Supplemento ordinario alla G.U. 18/2/92, n. 40. Tale norma lascia in vigore i soli comma 1 e 3 dell'articolo 1 della precedente Legge 924 del 12 giugno 1931, così come modificata dalla Legge 615 del 1 maggio 1941. La norma è stata modificata e integrata da:

- **Avviso di Rettifica in G.U. 15/12/92, n.294.**
- **D. M. 29 settembre 1995** “Riconoscimento dei titoli di laurea idonei ed equivalenti ai fini della sperimentazione animale (...) in Gazzetta Ufficiale 3 maggio 1996, n.102.
- **Circolari Ministeriali 32/92, 17/93 e 18/93 in G.U. 25/5/93, n. 120; 8/94 in G.U. 14/7/94, n. 163.**

Legge 413 del 12 ottobre 1993, norme sull’obiezione di coscienza alla sperimentazione animale. Pubblicata sulla G.U. 16/10/93, n.244.

Decreto Legislativo 633 del 12 novembre 1996, attuazione della direttiva 92/65/CEE che stabilisce norme sanitarie per gli scambi e le importazioni nella Comunità di animali, sperma, ovuli e embrioni non soggetti, per quanto riguarda le condizioni di polizia sanitaria, alle normative comunitarie specifiche di cui all’allegato A, sezione I, della direttiva 90/425/CEE.

Edizione fuori commercio

ISBN 88-8163-280-2



9 788881 632800