

MOGM

E SICUREZZA IN LABORATORIO

Progetto CCM "Promozione della
sicurezza nei laboratori che fanno uso di
Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM)"

RESPONSABILI SCIENTIFICI DEL PROGETTO

Elena Sturchio (INAIL- DIPIA ex ISPESL)
Grazia Ballacci (Ministero della Salute)

INAIL

DIPARTIMENTO INSTALLAZIONI
DI PRODUZIONE
E INSEDIAMENTI ANTROPICI



Ministero della Salute

Dipartimento Prevenzione e Comunicazione
Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria



Ministero della Salute

INAIL

DIPARTIMENTO INSTALLAZIONI DI PRODUZIONE
E INSEDIAMENTI ANTROPICI

Direttore della Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria
Fabrizio Oleari (Ministero della Salute)

Ex Commissario Straordinario dell'ISPESL
Antonio Moccaldi

Ex Direttore Generale dell'ISPESL
Umberto Sacerdote

Ex Direttore del Dipartimento Installazioni di Produzione e Inseidiamenti Antropici dell'ISPESL
Mario Mariani

Referenti Scientifici
Elena Sturchio (INAIL DIPIA Ex ISPESL)
Grazia Ballacci (Ministero della Salute)

Autori
Elena Sturchio
Elisabetta Bemporad
Giorgio Mari
Barbara Ficociello
Miriam Zanellato

Coordinamento Editoriale
Fabio Cassandra

Collaborazione alla realizzazione
Laura Casorri
Giuditta Simoncelli
Isabella Marchionni

“INAIL Dipartimento Installazioni di Produzione e Inseidiamenti Antropici Ex ISPESL”

Via Urbana, 167
00184 Roma

Stampa:
SI.S.COM S.r.l.

Il “Manuale relativo alla sicurezza nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati” è il risultato di attività di studio e di ricerca di un progetto del Centro Nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie (CCM) finanziato dal Ministero della Salute e realizzato da esperti ricercatori dell’ISPESL. Il progetto è stato realizzato in una coerente logica di aderenza agli scopi del CCM, istituito con la Legge n. 138 del 26/05/04 e del Decreto del Ministero della Salute 01/07/04, modificato dal Decreto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali del 18/09/08. Il CCM opera su tutto il territorio nazionale, al fine di garantire ai cittadini uguali possibilità di accesso agli interventi di prevenzione, attraverso una rete di collaborazione tra diverse strutture sanitarie, enti ed istituti di ricerca, nel rispetto del processo di regionalizzazione innescato dalla riforma del Titolo V della Costituzione. Questa iniziativa si colloca nell’ambito di un programma di promozione della sicurezza nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati e si propone di offrire un adeguato strumento di formazione sulle misure di contenimento e di tutela della salute dell’uomo e dell’ambiente, secondo la Direttiva 98/81/CE recepita in Italia con il Decreto Legislativo n. 206 del 12 aprile 2001. Il progetto scaturisce dall’esigenza di offrire a coloro che operano nel campo delle biotecnologie un’informazione intuitiva e dinamica, completa ed esauriente.

A questo scopo è stato quindi realizzato un cd-rom multimediale che documenta misure di contenimento, procedure e normativa aggiornata sulla sicurezza dei laboratori attraverso una rappresentazione virtuale degli ambienti di lavoro e degli strumenti professionali, consultabile dagli operatori in modo interattivo.

Il Direttore Generale
DG Prevenzione Sanitaria

Dott. Fabrizio Oleari



Gli sviluppi in campo biomedico (genomica, neuroscienze, oncologia molecolare, ecc.) e l'innovazione tecnologica (diagnostica medica, biotecnologie, informatica sanitaria, ecc.) indirizzano sempre più la sperimentazione e le sue applicazioni terapeutiche verso l'utilizzo dei microrganismi geneticamente modificati (MOGM).

In materia di prevenzione e di sicurezza per la salvaguardia della salute umana e dell'ambiente le relative misure da adottare nascono da un'accurata valutazione di rischio correlata con la produzione e/o con la commercializzazione dei prodotti biotecnologici, MOGM compresi. Infatti, tutti gli impieghi di MOGM, ottenuti con tecniche di trasferimento di informazioni genetiche, in Italia sono attualmente soggetti a severe procedure di notifica e di autorizzazione ed avvengono sotto il controllo dell'Autorità Competente ovvero il Ministero della Salute.

Il "Manuale relativo alla sicurezza nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati" è il risultato di attività di studio e di ricerca di un progetto CCM finanziato e realizzato da esperti ricercatori dell'ISPESL il cui intento è quello di offrire agli operatori biotecnologici un valido strumento operativo che riassume in sé la formazione, l'informazione, la divulgazione e l'interattività delle principali problematiche attinenti al settore delle biotecnologie.

Il presente cd-rom, evidenzia in maniera chiara ed esaustiva i processi lavorativi e le misure di controllo atte ad evitare o minimizzare il rilascio di MOGM nei luoghi di lavoro e nell'ambiente ed espone dettagliatamente la procedura di valutazione dei rischi correlati con l'impiego confinato di MOGM in conformità alla Direttiva 98/81/CE recepita in Italia con il D.Lgs n.206 del 12 aprile 2001.

Il Commissario Straordinario

Prof. Antonio Moccaldi



L'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) è un organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale (SSN). Esso è un ente di diritto pubblico, con funzioni tecnico - scientifiche di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione, assistenza, informazione e formazione in materia di prevenzione degli infortuni, sicurezza sul lavoro, tutela della salute negli ambienti di vita e di lavoro.

L'ISPESL svolge le sue funzioni in numerosi ambiti di ricerca e sperimentazione, autonomamente o in collaborazione con altre strutture del S.S.N. e con Enti pubblici e privati, di riconosciuto valore scientifico.

In collaborazione col Ministero della Salute l'ISPESL partecipa a progetti di ricerca finalizzata, all'elaborazione di proposte normative, nazionali ed internazionali, attraverso personale altamente qualificato nel controllo di specifici settori lavorativi.

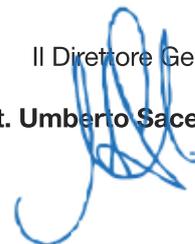
Fra gli importanti compiti istituzionali affidati all'ISPESL v'è quello di promuovere l'informazione e la formazione sia nel settore pubblico che in quello privato in materia di prevenzione e sicurezza sul lavoro, la tutela della salute negli ambienti di vita a causa delle attività antropiche sul territorio. Riguardo a tutto ciò l'ISPESL contribuisce alla diffusione scientifica e culturale ed alla formazione con partecipazione ad eventi e convegni, nonché pubblicazioni e linee guida.

È proprio in questa ottica che s'inserisce la realizzazione del presente manuale relativo alla sicurezza nei laboratori che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati.

Il manuale è stato trasposto in una particolare versione informatica che, grazie ad un software realizzato con il fattivo contributo di personale ISPESL, permette di animare ambienti virtuali tridimensionali, multimediali ed interattivi così da dare utile supporto tecnico-scientifico non solo agli operatori esperti che manipolano MOGM ma anche ai neofiti di questa materia. Con questa pubblicazione l'ISPESL si propone quindi di fornire un mezzo immediato di divulgazione per promuovere la cultura della prevenzione, della sicurezza, nonché la formazione e l'informazione nei luoghi di lavoro, pubblici e privati, che fanno uso di microrganismi geneticamente modificati (MOGM).

Il Direttore Generale

Dott. Umberto Sacerdote



Il Dipartimento Installazioni di Produzione e Insedimenti Antropici (DIPIA) è uno dei cinque Dipartimenti tecnico-scientifici centrali dell'ISPESL ed esso svolge compiti di ricerca, studio, sperimentazione, consulenza, proposta normativa ai fini della tutela della salute, della sicurezza e della compatibilità ambientale con riferimento agli ambienti di vita ed alle installazioni a rischio di incidente rilevante. In particolare il DIPIA, attraverso il Laboratorio di Biotecnologie e Microbiologia Ambientale, valuta i rischi connessi con l'impiego delle biotecnologie nell'industria, in agricoltura e in microbiologia ambientale. Ancora i ricercatori altamente qualificati di detto Laboratorio forniscono, fin dai primi sforzi legislativi, alle Autorità Competenti Nazionali consulenza tecnico-scientifica tanto da essere un valido supporto alle Commissioni Interministeriali di Valutazione per le Biotecnologie, istituite presso il Ministero della Salute e il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM), per l'applicazione di due Direttive Europee l'una sull'uso confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) (Direttiva 98/81/CE recepita dal D.Lgs. n. 206 del 12/4/2001) e l'altra sul rilascio deliberato di organismi geneticamente modificati (OGM) con riguardo alle procedure di autorizzazione ai fini della sperimentazione e della commercializzazione delle colture transgeniche (Direttiva 2001/18/CE, recepita dal D.Lgs. n. 224 dell'8 luglio 2003). Detta consulenza tecnico-scientifica ha una sua intrinseca consistenza in quanto si fonda su una costante attività di studio, di ricerca e di sperimentazione che i ricercatori del DIPIA talvolta svolgono in collaborazione con i ricercatori di altri Enti di ricerca, pubblici o privati, coinvolti in simili tematiche.

In tale prospettiva il DIPIA ha già portato a termine interessanti progetti di ricerca sul rilascio deliberato di OGM ed ha appena finito di realizzare il presente cd-rom sull'impiego confinato di MOGM che rappresenta il prodotto finale di un progetto CCM finanziato dal Ministero della Salute e cofinanziato dall' ISPESL. Detto cd-rom, attraverso l'utilizzo di una tecnologia informatica di simulazione virtuale, permette di controllare ogni oggetto e parametro della scena e consente di evidenziare tutte le caratteristiche tecniche e strutturali del laboratorio, le procedure di accesso e di uscita del personale e dei materiali, le procedure operative, le misure igieniche compatibili con la prevenzione, le misure di contenimento e le strumentazioni atte ad evitare o minimizzare il rilascio di MOGM nei luoghi di lavoro.

Il Direttore del DIPIA

Dott. Ing. Mario Mariani



Indice

Introduzione	I
Evoluzione della Normativa	1
Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206	5
Valutazione del rischio dell'impiego confinato	13
Terapie avanzate e medicinali innovativi	19
Vettori per terapia genica	24
Requisiti minimi di contenimento dei laboratori per impiego confinato di MOGM	35
Rifiuti	40
Principali attrezzature di laboratorio	62
Flusso del personale e procedure operative	77
Approfondimento sulle tecnologie di contenimento	84
Normativa nel campo degli isolatori	93

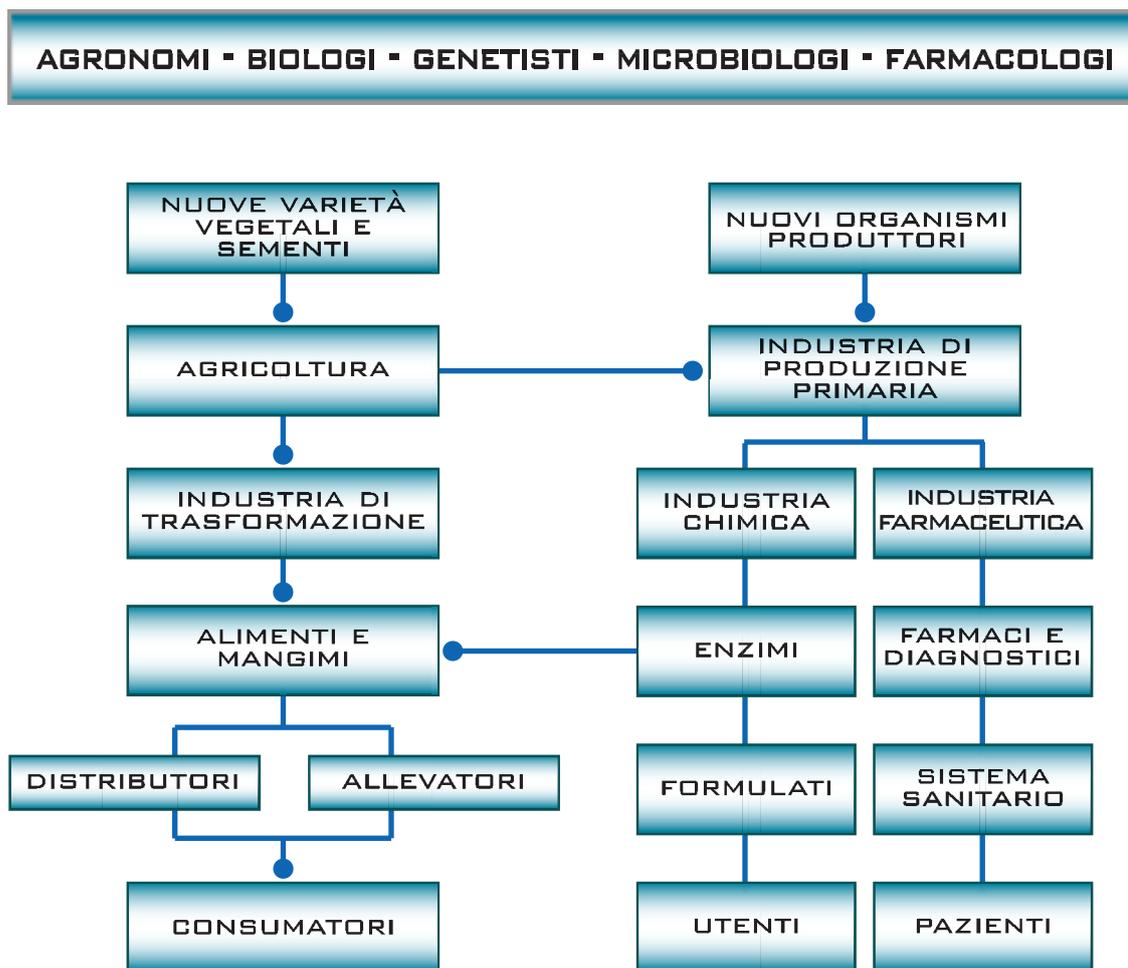
Introduzione

Le **biotecnologie** secondo l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) sono definite come l'applicazione della scienza e della tecnologia agli organismi viventi o a parte di essi per ottenere beni e servizi al fine di migliorare la qualità della vita dell'uomo.

Esse costituiscono l'insieme delle tecnologie che utilizzano organismi viventi (batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali di organismi semplici o complessi) o i loro derivati (organelli ed enzimi), per ottenere beni e servizi:

- produzione di *beni* ottenuti mediante l'impiego di nuovi organismi (miglioramento genetico di microrganismi, piante, animali) e/o dei loro prodotti (es. enzimi, ormoni), che derivano in larga misura dall'applicazione mirata di tecniche di modificazione genetica;
- fornitura di nuovi *servizi* (ad esempio diagnostica, terapia, prevenzione, trapianto), ottenuti in seguito alla migliore comprensione della fisiologia, della genetica e della biologia molecolare.

Il loro utilizzo trova applicazione in diversi settori, come illustrato nella Figura. 1:



La ricerca e le tecnologie basate sulla genetica e sulla biologia molecolare lasciano intravedere sostanziali prospettive d'innovazione in molti e differenti settori economici, pur continuando ad alimentare diffuse inquietudini.

Le tecniche e le tecnologie di base sono:

Fermentazione: processo chimico anaerobio e aerobio realizzato da un microrganismo che permette di ottenere un prodotto di trasformazione a partire da un substrato iniziale (vino dal mosto d'uva, aceto dal vino, yogurt dal latte).

Le fermentazioni (anaerobiche ed aerobiche) sono largamente usate da tempo per la produzione di metaboliti secondari da parte di una coltura di microrganismi nel momento di massima crescita. Lo sfruttamento industriale dei processi fermentativi ha permesso la produzione su larga scala di antibiotici, enzimi, lieviti, starter microbici, acidi organici, amminoacidi, vitamine. È possibile, per produrre composti specifici, impiegare microrganismi geneticamente modificati ottenuti mediante l'ingegneria genetica.

Bioconversione: modificazione della struttura chimica di una sostanza mediante l'uso di singoli enzimi o del sistema enzimatico cellulare di un agente biologico (microrganismo, cellula vegetale o cellula animale).

Colture cellulari: le cellule appartenenti a tessuti di organismi superiori (piante o animali) si possono isolare e coltivare in laboratorio per ottenere molecole e composti di grande utilità per l'uomo. Nel caso delle piante queste colture possono trovare applicazione nella produzione di molti metaboliti (farmaci, pigmenti, aromi, fragranze, vitamine, ecc.), mentre le colture di cellule animali trovano applicazione nella produzione di vaccini virali, interferoni e altre sostanze biologicamente attive e anticorpi monoclonali.

Anticorpi Monoclonali: produzione di anticorpi grazie alla fusione di una linfocita B, produttore di anticorpi ma con vita breve *in vitro*, con cellule trasformate (cellule mielomatose). Gli ibridomi cellulari ottenuti sono in grado di mantenere l'immortalità e di produrre anticorpi "monoclonali" che provengono, cioè, da un unico clone linfocitario. Essi sono estremamente specifici e quindi molto importanti per numerose applicazioni diagnostiche e terapeutiche, e nella purificazione delle proteine.

Ingegneria genetica: nota anche come tecnica del DNA ricombinante (rDNA), permette di agire sul DNA degli organismi, e quindi sulle loro caratteristiche genetiche, in modo mirato e selettivo; essa consente infatti di estrarre il DNA di un organismo, identificarne e separarne la porzione che interessa, ed inserirla, tal quale o previa modificazione, nel DNA di un organismo diverso, nel quale continuerà a svolgere la sua funzione.

Principali aspetti applicativi delle biotecnologie

Le applicazioni in *campo biomedico* rappresentano il settore al quale le biotecnologie hanno dato finora il contributo più significativo, sia in termini di prodotti (terapeutici, vaccini e diagnostici) che di ricerca e sviluppo (Tabella. 1).

TECNICHE MOLECOLARI	APPLICAZIONI
Genomica, ricerca genetica, sequenziamento del DNA, sintesi, ingegneria genetica	Diagnostica molecolare: Sonde nucleotidiche, che riconoscono specifiche sequenze di DNA. <i>Molecular fingerprinting</i>
culture cellulari e tissutali, ingegneria tissutale, ibridizzazione, fusione cellulare, vaccini o immunostimolanti, manipolazione embrionale	Vaccini: epatite virale B, meningite virale, pertosse immunodiagnostica: anticorpi monoclonali che riconoscono in modo specifico sostanze antigeniche, cellule neoplastiche, placche arteriosclerotiche, zone di necrosi del tessuto miocardico
terapia genetica, vettori virali	Terapia genica: SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease) determinata dall'alterazione del gene per l'enzima adenosina-deaminasi (ADA), fibrosi cistica, distrofia muscolare di Duchenne, emofilia A e B
sequenziamento/sintesi di proteine/peptidi, ingegneria glicolipidica/glicoproteica, proteomica	Prodotti terapeutici: somatostatina, insulina, ormone della crescita, interferoni, citochine, Colony Stimulating Factors (CSF), attivatore del plasminogeno, ormoni e fattori di crescita, recettori cellulari, sostanze messaggere, feromoni

Tabella. 1

Le applicazioni in *agricoltura e zootecnia* costituiscono un importante strumento per la difesa delle colture dagli agenti patogeni biotici ed abiotici, il miglioramento e la diversificazione della produzione, nonché lo sviluppo di nuovi prodotti per il settore zootecnico. In questo ultimo campo, la realizzazione più importante finora ottenuta è stata la produzione di ormone somatotropo bovino da parte di un microrganismo trasformato.

In Tabella. 2 sono illustrate le principali applicazioni biotecnologiche di piante geneticamente modificate.

PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE: APPLICAZIONI	
settore agroalimentare	<ul style="list-style-type: none"> - aumento o miglioramento della produzione agricola, delle caratteristiche organolettiche dei prodotti agricoli, produzione di cibo ad alto valore nutrizionale (pomodoro "Flavr Savr" con inibizione degli enzimi della degradazione della pectina, riso con un più elevato contenuto di proteine e/o contenente provitamina A, e soia con un contenuto più elevato di lisina) - resistenza a stress ambientali, patogeni e parassiti (es. mais Bt resistente alla piralide) - resistenza ad erbicidi poco inquinanti e facilmente biodegradabili (es. glifosato) - riduzione del rischio di indurre allergie in prodotti alimentari
settore ambientale	<ul style="list-style-type: none"> - uso delle piante per bonificare l'ambiente: fitoremediation (es.: agenti tossici e mutageni) - aumento della fertilità dei suoli
settore farmaceutico	- bioreattori per la produzione di vaccini, farmaci e anticorpi
settore fito - vivaistico	- nuove specie di piante ornamentali

Tabella. 2

L'*industria alimentare* rappresenta uno dei campi più importanti di applicazione delle biotecnologie poiché utilizza da sempre le bioconversioni per la trasformazione dei prodotti agricoli in alimenti (pane lievitato, vino, aceto, yogurt, crauti, formaggi). Le ricerche nel settore alimentare hanno permesso di identificare processi di trasformazione maggiormente selettivi e specifici, per minimizzare il più possibile i danni meccanici, termici e chimici nei prodotti alimentari causati dalle pratiche di lavorazione delle materie prime agricole, e per produrre alimenti con caratteristiche migliori (uniformità nella qualità e garanzie di igiene e sicurezza).

L'esigenza di un controllo nella qualità degli alimenti, che nasce dall'integrazione tra l'emergere delle nuove tecnologie e la crescente consapevolezza dei consumatori in tema di sicurezza alimentare, sta alimentando l'ascesa sul mercato dei test diagnostici per gli alimenti.

Una soluzione rapida ed efficiente potrebbe essere rappresentata dallo sviluppo di specifici biosensori che consentano di identificare e quantificare la presenza di composti o microrganismi.

Le biotecnologie trovano applicazione anche nei *processi industriali* in particolare nella realizzazione di prodotti a ridotto impatto ambientale o ottenuti da processi di bioconversione (amminoacidi, antibiotici, vitamine, polisaccaridi, carta e derivati della cellulosa).

Le emergenti *biotecnologie ambientali* possono infine soddisfare sia la necessità di assicurare il corretto smaltimento dei rifiuti e degli effluenti in tempi medio-brevi e, a lungo termine, sia la realizzazione di prodotti "puliti" a partire da materie prime rinnovabili, sia l'ottenimento di rifiuti ecocompatibili.

Evoluzione normativa

Nel corso degli anni sono emerse preoccupazioni riguardanti i potenziali rischi che l'utilizzazione delle biotecnologie può comportare per la salute umana e per l'ambiente. Su questo aspetto si è soffermata la Comunità Europea che ha emanato delle disposizioni legislative riguardanti il rilascio deliberato nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati quali le Direttive 90/220/CEE e 90/219/CEE. Tali direttive adottate a partire dal 1990, sono state poi modificate rispettivamente dalle Direttive 98/81/CEE e 2001/18 /CEE.

In Italia la sicurezza delle attività che comportano l'utilizzo di materiale geneticamente modificato è garantita dall'operatività di decreti che recepiscono il contenuto delle suddette Direttive Europee rivolte alla tutela dell'uomo, dell'ambiente e dell'ecosistema in generale. Queste disposizioni stabiliscono in particolare le misure e le norme procedurali da ottemperare per chiunque voglia manipolare, produrre in laboratorio, utilizzare o rilasciare nell'ambiente esterno microrganismi o organismi geneticamente modificati.

LA NORMATIVA SULL'IMPIEGO CONFINATO DI MICROORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI

Con il Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206, viene data attuazione in Italia alla Direttiva 98/81/CE, che modifica la precedente Direttiva 90/219/CE sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati (MOGM). Il nuovo decreto supera, abrogandolo, il Decreto Legislativo 3 Marzo 1993 n. 91, che recepiva la precedente direttiva. Il Decreto attualmente in vigore stabilisce le misure per l'impiego confinato dei MOGM, volte a tutelare la salute dell'uomo e dell'ambiente.

Perché si è voluta una revisione della Direttiva 90/219/CEE?

La Direttiva 90/219/CEE è stata revisionata al fine di:

- armonizzare la Direttiva sull'uso confinato dei MOGM con la Direttiva riguardante la protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti biologici (2000/54/CE);
- classificare gli impieghi confinati dei MOGM in base ai rischi che comportano per la salute umana e per l'ambiente (tale classificazione deve essere coerente con la prassi internazionale e basarsi su una specifica valutazione dei rischi);
- sviluppare procedure amministrative e obblighi di notifica in relazione ai rischi degli impieghi confinati;
- adeguare le parti tecniche al progresso scientifico;
- aumentare la trasparenza e la fiducia del pubblico;
- chiarire ed estendere il campo di applicazione della Direttiva;
- adottare e applicare misure appropriate per la gestione dei rifiuti derivanti dagli impieghi confinati dei MOGM.

Principali modifiche del D. Lgs n.206 del 2001 rispetto al precedente D. Lgs n. 91 del 1993

La revisione della Direttiva ha portato ad un diverso approccio nella valutazione del rischio che, non più basata solo sul sistema biologico isolato, deve considerare l'agente biologico nella realtà del laboratorio o dell'impianto attraverso una valutazione complessiva. Secondo la Direttiva modificata, infatti, la valutazione del rischio del microrganismo costituisce solo una parte della valutazione del rischio complessivo.

Secondo la Direttiva 90/219/CEE, recepita in Italia con il D. Lgs 91/93, la valutazione del rischio, riferita ai MOGM, classificava questi ultimi in due soli gruppi di rischio.

In sostanza ricadevano nel **gruppo I** quei MOGM per i quali non era da attendersi alcun rischio per la salute umana o per l'ambiente, e che presentavano le seguenti caratteristiche:

- il microrganismo RICEVENTE o parentale non è in grado di conferire patologie a persone animali o piante;
- la natura del VETTORE/INSERTO è tale da non conferire al MOGM un genotipo in grado di causare patologie per uomo, animali o piante;
- il MOGM non è in grado di conferire patologie a persone animali o piante e non è in grado di causare effetti negativi nell'ambiente.

Nel **gruppo II** invece ricadevano tutti gli altri microrganismi geneticamente modificati.

Inoltre non veniva indicato alcun criterio per scegliere, nel caso dei MOGM di gruppo II, il livello di contenimento adeguato tra i tre presentati nel vecchio Allegato IV.

La discordanza di numerazione tra questi tre livelli di contenimento (numerati da 1 a 3) e le analoghe misure di contenimento previste dal superato D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 (numerate da 2 a 4, in accordo con l'uso ormai internazionale delle sigle P1-P2-P3-P4) era spesso causa di notevole confusione.

Le **operazioni** con MOGM erano poi distinte in due tipi (**A** o **B**) a seconda che si trattasse di operazioni eseguite a scopo di insegnamento, ricerca o sviluppo o di operazioni industriali o commerciali. Le operazioni di tipo A o B erano soggette a procedure distinte: ad esempio era richiesta una notifica per operazioni di tipo IB ma non per operazioni di tipo IA.

La distinzione tra A e B, di fatto non basata sull'entità del rischio, nella nuova direttiva è scomparsa.

Elementi presenti anche nella normativa precedente, ma trattati più estesamente e approfonditamente nella nuova normativa, sono **la valutazione del rischio**, cui è dedicato il nuovo Allegato III, ed i requisiti minimi che caratterizzano i vari livelli di contenimento (Allegato IV).

- I principi che riguardano la valutazione del rischio vengono enunciati nell'*Allegato III* della nuova direttiva.
- Nell'*Allegato IV*, vengono invece stabiliti i requisiti minimi che caratterizzano i vari livelli di contenimento. Tali requisiti minimi sono risultati essere più restrittivi di quelli enunciati nella direttiva precedente (nonché di quelli previsti dal superato D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81).

Direttiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009

Considerate le diverse e sostanziali modifiche che ha subito la Direttiva 90/219/CEE, per ragioni di chiarezza, si è effettuata la rifusione delle disposizioni in questione con la Direttiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009. I nuovi elementi introdotti nella direttiva riguardano esclusivamente le procedure di comitato, pertanto non è stato necessario provvedere al recepimento della stessa da parte degli Stati Membri.

VALUTAZIONE DELLA CLASSE DELL'IMPIEGO CONFINATO

Elemento essenziale per la preparazione di una notifica di impiego è la valutazione della classe dell'impiego confinato che si intende eseguire (art. 5 del D. Lgs 206/01). In analogia con i gruppi di rischio da 1 a 4 previsti dal D. Lgs 81/2008, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro, sono previste quattro classi di impiego, definite sulla base del livello di contenimento necessario a proteggere la salute umana e l'ambiente dai possibili rischi connessi con l'uso di un particolare MOGM (Tabella. 3).

CLASSE 1	impieghi confinati 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	impieghi confinati 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	impieghi confinati 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	impieghi confinati ad alto rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 4 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente

Tabella. 3

Il livello di contenimento adeguato a garantire la sicurezza determina la classe dell'impiego confinato.

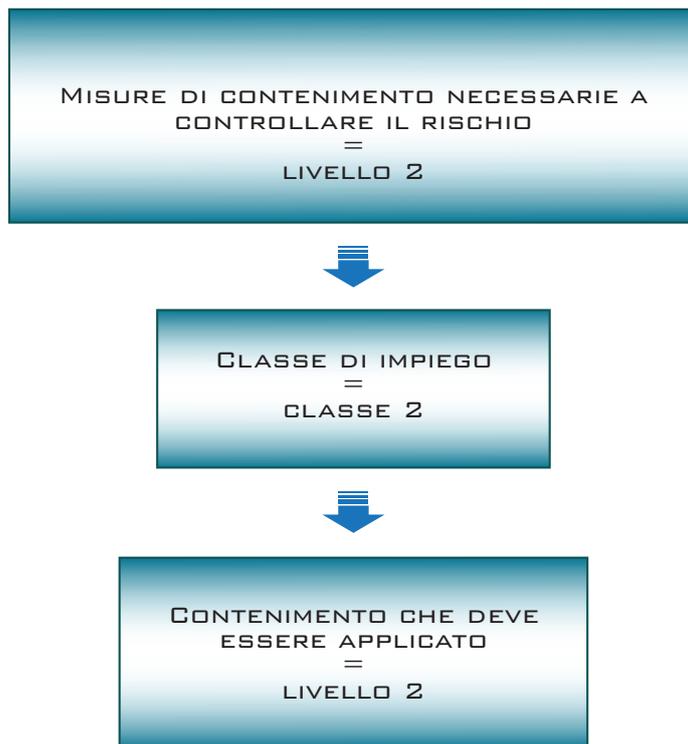
Le **classi di impiego confinato** sono il nuovo requisito introdotto dalla normativa sui MOGM.

Queste 4 classi, correlate alle misure di contenimento e identificate attraverso un'adeguata valutazione del rischio, sono necessarie a controllarne il rischio.

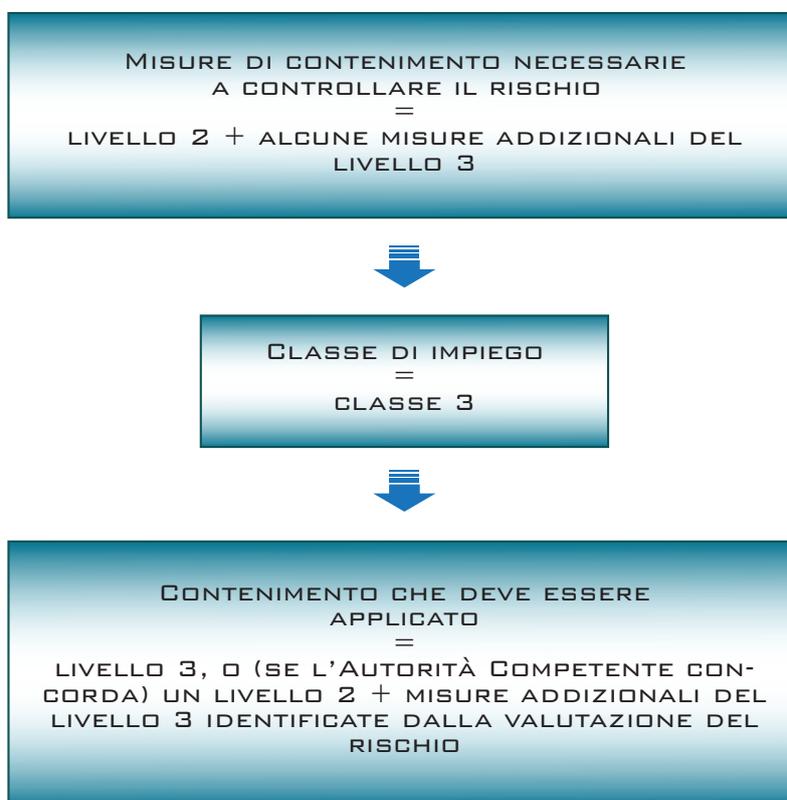
Le tappe procedurali che consentono di assegnare la classe d'impiego sono:



Nella maggior parte dei casi le misure di contenimento necessarie a controllare il rischio e la classe di impiego che deve essere applicata sono le stesse.



In alcuni casi le misure di contenimento per controllare il rischio possono consistere in un insieme di misure derivanti da due livelli differenti.



La richiesta di applicare un contenimento più basso rispetto alla classe di impiego deve essere fatta dal notificante al momento della notifica, e un'adeguata valutazione del rischio deve essere effettuata per giustificare tale richiesta.

Senza l'autorizzazione dell'Autorità Competente e fino a quando non si ottiene, non si può applicare un livello di contenimento più basso della corrispondente classe di impiego.

Obiettivo primario è quindi selezionare le misure fisiche di contenimento e le procedure di sicurezza associate in base al livello di rischio per la salute umana e per l'ambiente.

Alcuni esempi di contenimenti misti:

- un impiego può richiedere un livello 2 di contenimento ma (poiché si fa uso di patogeni delle piante presenti nei pressi dell'impianto) è necessario che il laboratorio si doti di un sistema di ventilazione del ricircolo del flusso di aria verso l'interno.
- un impiego può necessitare di un livello di contenimento 3 ma dall'esame dettagliato della valutazione del rischio si può evidenziare ad esempio che non sia necessario che il laboratorio sia sigillabile per la fumigazione.

Se la sperimentazione prevede di testare i MOGM in animali, il livello di contenimento applicato per gli stabulari deve essere corrispondente a quello adottato per i laboratori dove vengono prodotti i MOGM.

Considerando che i MOGM sono agenti biologici, in primo luogo è necessario adottare misure di prevenzione dell'esposizione.

È possibile *prevenire l'esposizione*:

- eliminando l'uso di MOGM, a favore di tecniche alternative (es. utilizzo di sonde geniche e prodotti di PCR);
- sostituendo uno specifico MOGM con altri meno pericolosi.

Qualora questo non fosse realizzabile è necessario identificare altre misure che ne controllino l'esposizione. È possibile *controllare l'esposizione*:

- disegnando il processo di lavoro e le misure di controllo ingegneristiche per evitare o minimizzare il rilascio di MOGM nei luoghi di lavoro come processi e sistemi di manipolazione totalmente chiusi (cappe di classe III, fermentatori chiusi), contenimento di aerosol, utilizzo di cappe di sicurezza biologica;
- corretta gestione delle attrezzature e monitoraggio delle misure di controllo;
- fornendo un impianto di ventilazione, che può includere la pressione negativa;
- tenendo un registro dei lavoratori esposti;
- effettuando operazioni di pulizia e disinfezione al termine di ogni attività di lavoro;
- riducendo il tempo di esposizione del lavoratore;
- dotando l'operatore dei dispositivi di protezione individuale;
- usando misure di igiene per la prevenzione o riduzione del rilascio accidentale di MOGM dal luogo di lavoro come:
 - ✓ disinfettare le superfici secondo procedure specifiche;
 - ✓ prevedere adeguate strutture per lavaggio, cambio e conservazione di vestiti, incluse le modalità per lavare i vestiti contaminati;
 - ✓ vietare di mangiare, fumare etc.;
 - ✓ vietare di pipettare a bocca;
 - ✓ fornire i mezzi per una raccolta sicura, conservazione, trattamento ed eliminazione dei rifiuti, incluso l'uso di contenitori sicuri ed identificabili (anche il livello minimo di contenimento richiede l'inattivazione dei rifiuti solidi e liquidi);
 - ✓ utilizzare sistemi sicuri per il trasporto di MOGM all'interno dei luoghi di lavoro;
 - ✓ elaborazione di piani di emergenza per eventuali incidenti con i MOGM;
 - ✓ monitorando (se necessario e tecnicamente possibile) la presenza di MOGM fuori dal contenimento fisico primario;
 - ✓ evitando l'uso di taglienti, eccetto se necessario, usare pipette in plastica o simili se indicato dalla valutazione del rischio;
 - ✓ esponendo il segnale di rischio biologico;
 - ✓ se appropriato, effettuando le vaccinazioni necessarie.

Decreto Legislativo 12 aprile 2001 n.206

Il **Decreto Legislativo 206/2001**, attuazione della **Direttiva 98/81/CE** che modifica la **Direttiva 90/219/CE**, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati, stabilisce le misure per l'impiego confinato dei microrganismi geneticamente modificati (MOGM), volte a tutelare la salute dell'uomo e dell'ambiente.

Definizioni

Per **Microorganismo** si intende "ogni entità microbiologica cellulare o non cellulare (inclusi i virus, viroidi e le cellule animali o vegetali in coltura) capace di replicarsi o di trasferire geni."

Per **MOGM** si intende "un microrganismo il cui materiale genetico è stato modificato in un modo che non avviene in natura per incrocio e/o ricombinazione naturale" La modificazione genetica avviene almeno mediante l'impiego delle tecniche elencate nell'Allegato I parte A.

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

Per **Incidente** si intende "ogni evento imprevisto che comporti una diffusione non intenzionale di agenti biologici e di MOGM nel corso del loro impiego confinato che possa presentare un pericolo immediato o differito, per la salute dell'uomo o per l'ambiente".

Per **Utilizzatore** si intende "il responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato di MOGM".

Per **Titolare dell'impianto** si intende "il datore di lavoro così come definito dall'art.2 del D. Lgs 626".

Per **Notifica** si intende "la presentazione da parte dell'utilizzatore o del titolare dell'impianto al Ministero della Salute dei documenti contenenti le informazioni richieste a norma del presente decreto."

Campo di applicazione

Ricadono nel campo di applicazione della normativa tutte le attività che implicano l'uso di MOGM, inclusa la semplice conservazione di ceppi o linee cellulari.

Nell'**Allegato I Parte A** vengono specificate quali tecniche sono da considerarsi atte all'ottenimento di un microrganismo geneticamente modificato:

- 1) 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 al di fuori dell'organismo (DNA+virus, plasmide, 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;
- 2) microinoculazione e macroinoculazione, microincapsulazione;
- 3) tecniche di fusione cellulare o di ibridazione che producono cellule vive con nuove combinazioni di materiale genetico mediante fusione di cellule con metodi non presenti in natura.

Inoltre, considerato che per microorganismo si intende "ogni entità microbiologica cellulare o non cellulare (inclusi i virus, viroidi e le cellule animali o vegetali in coltura) capace di replicarsi o di trasferire geni." ricadono nell'ambito della normativa vettori virali, pur se difettivi per la replicazione, proposti per terapia genica, ma capaci di trasferire geni.

Sono esclusi dal campo di applicazione i microrganismi modificati con tecniche di mutagenesi tradizionale, con la fusione cellulare procariotica ed eucariotica mediante processi fisiologici noti e i MOGM ottenuti tramite autoclonazione (*self-cloning*), purché non patogeni per uomo, animali o piante (**Allegato II parte A**).

Criteri di esclusione

A livello comunitario la **Decisione del Consiglio dell'8 marzo 2001 che integra la Direttiva 90/219/CEE relativamente ai criteri per stabilire la sicurezza per la salute umana e l'ambiente di alcuni tipi di microrganismi geneticamente modificati**, prevede una procedura per giungere alla compilazione di un elenco di MOGM che, soddisfacendo restrittivi criteri di sicurezza per la salute umana e per l'ambiente, vengono esclusi dal campo di applicazione della direttiva 98/81/CE. Tali criteri vengono enunciati nell'**Allegato II parte B** alla Decisione del Consiglio dell'8 marzo 2001.

Criteri per stabilire la sicurezza dei MOGM per la salute umana e l'ambiente

(devono essere integrati da note esplicative)

Nel presente Allegato sono descritti, in termini generali, i criteri che consentono di stabilire la sicurezza di determinati tipi di MOGM per la salute umana e l'ambiente e la loro idoneità ad essere inseriti nella parte C dell'Allegato II. Esso sarà integrato da note esplicative che forniranno una guida per facilitare l'applicazione di tali criteri che saranno stabiliti e, se è il caso, modificati dalla Commissione secondo la procedura di cui all'articolo 21.

1. Introduzione

I tipi di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) inseriti nella parte C secondo la procedura di cui all'articolo 21 non rientrano nella sfera di applicazione della presente direttiva. L'inserimento di un MOGM in tale elenco avviene solo previo esame caso per caso e l'esclusione riguarda un MOGM ben definito. L'esclusione riguarda solo i MOGM destinati ad un impiego confinato, come da definizione dell'articolo 2, lettera c), ma non l'immissione deliberata di MOGM nell'ambiente. Per essere inserito nell'elenco di cui alla parte C un MOGM deve essere conforme ai criteri specificati di seguito.

2. Criteri Generali

Verifica/convalida del ceppo

Occorre stabilire con precisione l'identità del ceppo ed inoltre conoscere e verificare la modificazione.

Prove documentate e riconosciute della sicurezza del MOGM

Occorre fornire documenti a riprova della sicurezza dell'organismo.

Stabilità genetica

Qualora un'eventuale instabilità genetica possa influire negativamente sulla sicurezza dell'organismo, occorre fornire prova della sua stabilità genetica.

3. Criteri Specifici

Assenza di patogenicità

Il MOGM non deve causare malattie o danni alla salute di soggetti umani, piante o animali. La patogenicità comprende anche la tossinogenicità e l'allergenicità.

Di conseguenza il MOGM deve essere caratterizzato anche da:

Assenza di tossinogenicità

Il MOGM non deve comportare un incremento della tossinogenicità a causa della modificazione genetica subita, né essere noto per le sue proprietà tossinogeniche.

Assenza di allergenicità

Il MOGM non deve comportare un incremento dell'allergenicità a causa della modificazione genetica subita, né essere un noto allergene dotato, in particolare, di proprietà allergeniche comparabili a quelle dei microrganismi identificati nella Direttiva 2000/54/CEE relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro.

Assenza di agenti nocivi avventizi

Il MOGM non deve ospitare accidentalmente agenti noti, ad esempio altri microrganismi, in stato attivo o latente, presenti nei pressi o all'interno del MOGM, che potrebbero causare danni alla salute umana o all'ambiente.

Trasferimento di geni

Il materiale genetico modificato non deve risultare dannoso se trasferito, né essere auto trasmissibile o trasferibile con frequenza superiore a quella di altri geni del microrganismo ricevente o parentale.

Sicurezza per l'ambiente in caso di dispersione significativa non intenzionale

Il MOGM non deve produrre effetti negativi sull'ambiente, né nell'immediato né a distanza di tempo, qualora dovesse verificarsi un incidente che comporti una significativa dispersione non intenzionale del MOGM. I MOGM che non rispondono ai criteri di cui sopra non possono essere inseriti nella parte C.

Per facilitare l'applicazione di tali criteri la Commissione deve poter adottare note esplicative dettagliate secondo la procedura di cui all'art.21 (Allegato II parte C che soddisfino i criteri specificati nell'Allegato II parte B).

Sono inoltre esclusi i MOGM che siano stati immessi sul mercato secondo la parte C della Direttiva 90/220/CE modificata dalla Direttiva 2001/18/CE o secondo normative a questa equivalenti sotto il profilo della valutazione di impatto ambientale (prodotti medicinali contenenti MOGM approvati dall'EMA con procedura centralizzata).

COMMISSIONE INTERMINISTERIALE DI VALUTAZIONE

Ai fini del Decreto Legislativo 206/2001 il Ministero della Salute coordina le attività amministrative e tecnico-scientifiche relative all'impiego confinato dei microrganismi geneticamente modificati, in collaborazione con i Ministeri dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, delle Politiche agricole e forestali, dell'Interno, delle attività Produttive, dell'Istruzione, dell'Università

e della Ricerca. Presso il Ministero della Salute, secondo quanto previsto dall'art. 14 dello stesso decreto, è istituita una Commissione interministeriale di valutazione composta dai rappresentanti di tutte le istituzioni coinvolte nella materia.

Presidente: Direttore generale del Dipartimento della prevenzione sanitaria del Ministero della Salute (o un suo sostituto)

7 rappresentanti dei Ministeri coinvolti:

- ✓ un rappresentante del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali - Settore Salute
- ✓ un rappresentante del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali - Settore Lavoro
- ✓ un rappresentante del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare
- ✓ un rappresentante del Ministero delle Politiche agricole e forestali
- ✓ un rappresentante del Ministero delle Attività Produttive
- ✓ un rappresentante del Ministero dell'Interno
- ✓ un rappresentante del Ministero dell'Università e della Ricerca scientifica e tecnologica

11 esperti di comprovata competenza scientifica:

- ✓ un esperto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali - Settore Salute
- ✓ un esperto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare
- ✓ un esperto del Ministero delle Politiche agricole e forestali
- ✓ un esperto del Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali - Settore Lavoro
- ✓ due esperti dell'Istituto Superiore di Sanità
- ✓ due esperti dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e Ricerca Ambientale
- ✓ un esperto dell'Agenzia nazionale per la protezione civile
- ✓ due esperti dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro.

1 rappresentante designato dalla Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato, le Regioni e Province Autonome.

Le funzioni di segreteria sono svolte a cura del Dipartimento della prevenzione sanitaria del Ministero della Salute, presso il quale ha sede la Commissione Interministeriale di Valutazione.

La Commissione dura in carica quattro anni e svolge i seguenti compiti:

- esamina le notifiche di impiego e di impianto ed esprime parere sulle stesse;
- esprime parere su ogni altra questione relativa agli aspetti considerati dal decreto citato;
- promuove, ove lo ritenga necessario, la richiesta di parere al Consiglio Superiore di Sanità e al Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie e le Scienze della Vita della Presidenza del Consiglio dei Ministri.

Tra i compiti del Ministero della Salute in materia di biotecnologie, c'è quello di inviare alla Commissione Europea, entro il 31 dicembre di ogni anno, una relazione sintetica sugli impieghi confinati delle classi 3 e 4 notificati nel corso dell'anno, con la descrizione, i fini ed i rischi connessi all'impiego. Ogni tre anni, a partire dal 5 giugno 2003, lo stesso Ministero invia alla Commissione Europea una sintetica relazione relativa all'esperienza acquisita.

STESURA DELLE NOTIFICHE

Il Decreto Legislativo 206/01 prevede un regime di notifica e autorizzazione per gli impieghi confinati che ricadono nel suo campo di applicazione e per gli impianti ove si intende mettere in atto tali impieghi. Tutte le notifiche, sia di impiego che di impianto, devono essere presentate al Ministero della Salute, Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria.

La valutazione della classe dell'impiego confinato

Elemento essenziale per la preparazione di una notifica di impiego è la valutazione della classe dell'impiego confinato che si intende eseguire (art. 5 del D. Lgs 206/01). In analogia con i gruppi di rischio da 1 a 4 previsti dal D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro, sono previste quattro classi di impiego, definite sulla base del livello di contenimento necessario a proteggere la salute umana e l'ambiente dai possibili rischi connessi con l'uso di un particolare MOGM. **Il livello di contenimento adeguato a garantire la sicurezza determina la classe dell'impiego confinato.**

Il nuovo requisito introdotto dalla normativa sui MOGM sono le 4 classi di impiego confinato che sono correlate alle misure di contenimento identificate attraverso la valutazione del rischio in quanto necessarie a controllare il rischio.

La richiesta di applicare un contenimento più basso rispetto alla classe di impiego deve essere fatta dal notificante al momento della notifica, e un'adeguata valutazione del rischio deve essere effettuata per giustificare tale richiesta. Senza autorizzazione dalla Autorità Competente e fino a quando non si ottiene, non si può applicare un livello di contenimento più basso della corrispondente classe di impiego.

Obiettivo primario è selezionare le misure fisiche di contenimento e le procedure di sicurezza associate in base al livello di rischio per la salute umana e per l'ambiente.

Quando esiste un dubbio sull'assegnazione della classe di un impiego confinato viene scelta la classe con misure di protezione più rigorose.

Si noti che mentre a norma del D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 si classificano in gruppi di rischio gli agenti biologici, ed è fornita nell'Allegato XLVI allo stesso decreto una lista positiva di tutti i patogeni umani conosciuti con l'assegnazione al relativo gruppo di rischio, qui l'oggetto della classificazione non sono i MOGM (poiché è impossibile elencare tutti i possibili MOGM) bensì gli impieghi previsti.

È compito del notificante quello di valutare, seguendo le linee indicate nell'**Allegato III** al D. Lgs 206/01, quali siano le misure di contenimento minime adeguate al caso, scegliendole tra i quattro progressivi livelli di contenimento specificati nell'**Allegato IV** allo stesso decreto. Nel processo di valutazione, delineato nell'Allegato III, si tiene conto anche della presenza o meno, nei pressi dell'impianto, di specie animali o vegetali suscettibili ad una eventuale azione patogena del MOGM.

Allegato III

Principi da seguire per la valutazione dell'impiego confinato:

A. Elementi di valutazione

1. Sono considerati gli effetti potenzialmente nocivi.
2. Tale valutazione si deve basare sull'identificazione dei possibili effetti nocivi per l'uomo e per l'ambiente associati con il microrganismo ricevente, materiale genetico inserito (proveniente da un organismo donatore), il vettore, il microrganismo donatore, il MOGM risultante.
3. Le caratteristiche dell'impiego confinato.
4. La gravità degli effetti potenzialmente nocivi.
5. La probabilità che gli effetti nocivi si realizzino (dipendente dal tipo di operazioni effettuate, dalla portata e natura di tali operazioni insieme alle condizioni di contenimento).

B. Procedura della valutazione del rischio

1. Individuazione del livello di rischio associato al MOGM:
Al fine di rinvenire notizie utili alla procedura di valutazione, l'utilizzatore può fare riferimento a normative nazionali e comunitarie pertinenti, in particolare il D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 ovvero a normative internazionali purché rappresentino il risultato di nuove conoscenze scientifiche o del progresso tecnico nella specifica materia. Tali normative riguardano i microrganismi naturali e si basano sulla capacità dei microrganismi di provocare malattie per gli esseri umani, animali o piante e sulla gravità e trasmissibilità della malattia che essi sono in grado di provocare e sulla possibilità di avere efficaci misure profilattiche o terapeutiche. Il D. Lgs 9 Aprile 2008, n. 81 classifica i microrganismi, in quanto agenti biologici, in 4 gruppi di rischio in base ai loro effetti potenziali su un individuo sano adulto.
Tali gruppi di rischio possono essere usati dall'utilizzatore come riferimento per la classificazione delle attività di impiego confinato nelle 4 classi di rischio di cui all'art.5.
L'utilizzatore può anche consultare schemi di classificazione che si riferiscono ad agenti patogeni per piante o animali (**Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie - Classificazione degli agenti patogeni per gli animali o vegetali - Presidenza del Consiglio dei Ministri**).
Tali normative forniranno solo un'indicazione provvisoria della classe di rischio dell'impiego confinato e delle relative misure di contenimento.
2. Al fine di selezionare le misure di contenimento si devono tener presenti le caratteristiche dell'ambiente potenzialmente esposto ai MOGM, l'entità dell'impiego, o operazioni particolari.
3. Sulla base degli elementi al punto 2 il livello di rischio del MOGM associato all'impiego confinato, può essere ridotto o incrementato.
4. Tale valutazione eseguita in conformità alle indicazioni precedenti deve consentire l'assegnazione dell'impiego confinato ad una delle 4 classi.

È chiaro che un impiego di una determinata classe potrà essere eseguito solo in un impianto che realizzi le corrispondenti misure di contenimento. Sarà cura dell'Autorità Competente verificare la corrispondenza tra classe di impiego e livello di contenimento realizzato presso l'impianto proposto per la sua esecuzione, avendo anzitutto verificato la correttezza della classe proposta dal notificante sulla base della propria valutazione.

Tale valutazione (e la conseguente scelta della classe da assegnare all'impiego) va argomentata per iscritto, e costituisce un documento che deve essere conservato presso l'impianto.

L'intero documento (nei casi di notifiche di impieghi di classe 3 o 4) od una sua sintesi (nel caso di notifiche di impieghi di classe 2) forma parte integrante ed essenziale della notifica di impiego.

Nella valutazione si deve tener conto ad esempio:

- di un possibile recupero della competenza alla replicazione e delle possibili conseguenze di un evento incidentale che porti ad infezioni e integrazione in cellule non bersaglio di un vettore virale, difettivo per la replicazione, ma capace di promuovere costitutivamente la sintesi di molecole biologicamente attive.
- Si deve valutare il rischio connesso a MOGM contenenti i geni che controllano la proliferazione cellulare, l'immortalizzazione, l'apoptosi, o geni che codificano per fattori ad alto impatto biologico (come fattori di crescita, citochine e neurotrasmettitori) oppure sequenze sconosciute.

Qualora si utilizzino agenti patogeni per l'uomo, i criteri di valutazione da adottare si fondano sulle caratteristiche di pato-

genicità del vettore virale di partenza desunte dall'elenco degli agenti patogeni descritto nel D.Lgs 9 Aprile 2008, n. 81.

La notifica di impianto

In ordine di tempo, la prima notifica da presentare sarà quella relativa all'impianto, per la quale potrà essere utilizzato l'apposito modulo reperibile sul sito web del Ministero della Salute (Mod. notifica impianto MOGM).

La notifica dovrà essere firmata e presentata al Ministero della Salute dal titolare dell'impianto, da identificarsi con il datore di lavoro ai sensi del D.Lgs 9 Aprile 2008, n. 81.

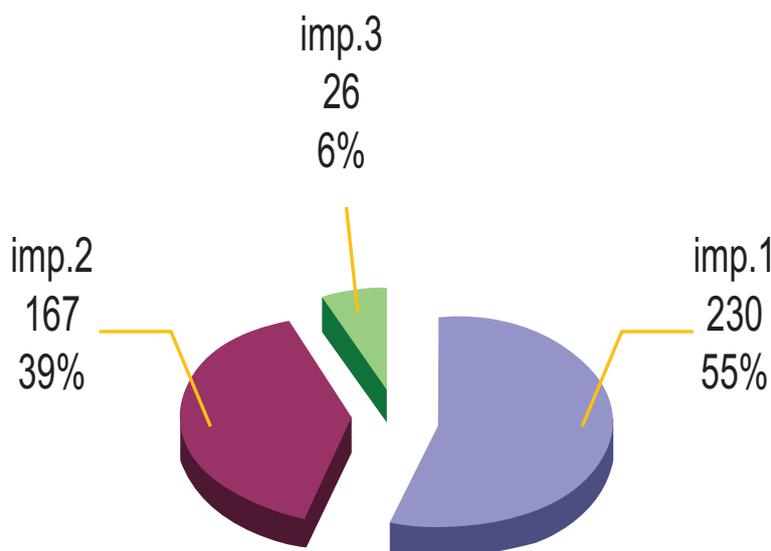
Essa contiene le informazioni relative all'impianto, come specificato nella parte A dell'Allegato V al D. Lgs 206/01. Non contiene informazioni relative ai MOGM, che saranno contenute nelle notifiche di impiego, obbligatorie per impieghi di classe 2, 3 o 4. Solo per impieghi di classe 1, per i quali non è prevista ulteriore notifica, la notifica di impianto conterrà un riepilogo della valutazione di cui sopra, oltre ad informazioni sulla gestione dei rifiuti. Per tutti gli impieghi, inclusi quelli di classe 1, i documenti di valutazione completi saranno conservati presso l'impianto.

È responsabilità del titolare dell'impianto informare il Ministero della Salute riguardo qualsiasi modifica delle informazioni contenute nella notifica di impianto, in modo che il relativo fascicolo esistente presso il Ministero risulti costantemente aggiornato. Fatti salvi gli aggiornamenti successivi, la notifica di impianto viene eseguita una sola volta, prima del primo impiego. Modifiche sostanziali dell'impianto richiederanno comunque la presentazione di una nuova notifica.

Per impianti destinati esclusivamente ad impieghi di classe 1 vige un regime di silenzio/assenso con un termine di 45 giorni, trascorsi i quali, in assenza di indicazioni contrarie, gli impieghi di classe 1 possono iniziare.

Per gli impianti destinati ad impieghi di classi superiori è necessaria una esplicita autorizzazione scritta da parte del Ministero della Salute, con i termini indicati nell'art. 7. Tali termini decorrono dalla data di ricevimento, da parte del Ministero della Salute, della notifica di impianto completa di attestato di pagamento della relativa tariffa (cfr. paragrafo 5) e si intendono sospesi durante i periodi in cui il Ministero è in attesa di ulteriori informazioni eventualmente richieste.

Nel caso di impianti destinati ad impieghi di classe 4 è prevista (art. 11, commi 6 e 7) una procedura che mette in grado la popolazione interessata di esprimere preventivamente il proprio parere in merito alla richiesta di autorizzazione all'impianto.



IMPIANTI AUTORIZZATI PER TIPOLOGIA

Figura. 2 - Situazione degli impianti notificati fino al 2009 in Italia

La notifica di impiego

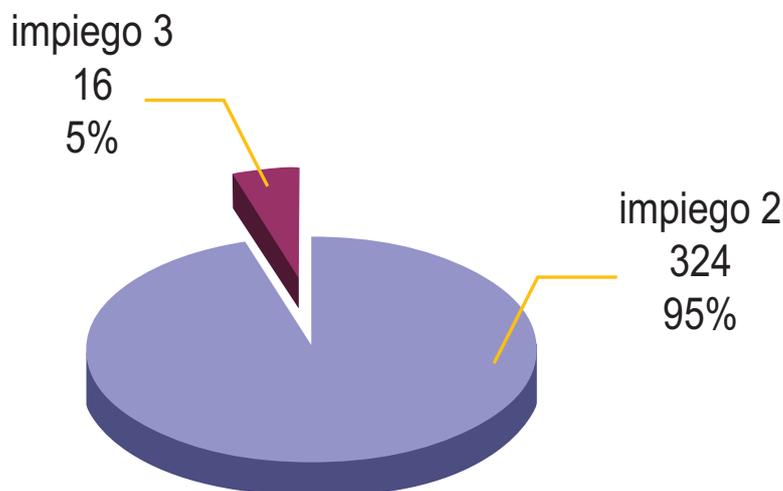
La notifica di impiego di un determinato MOGM (con indicazione del microrganismo ricevente o ospite, del tipo di inserto e dell'eventuale vettore utilizzato) viene presentata dall'utilizzatore, figura da identificarsi con il responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato. Si potrà trattare, ad esempio, del ricercatore che coordina l'attività di ricerca con il MOGM in questione (o analoga figura in campo industriale). È a lui che compete la valutazione e la conseguente assegnazione dell'impiego confinato ad una delle 4 classi.

La notifica, per l'inoltro della quale al Ministero della Salute si potrà utilizzare uno dei moduli reperibili sul sito web (mod. notifica impiego MOGM classe 2, mod. notifica impiego MOGM classe 3 e 4) dovrà essere vistata dal titolare dell'impianto, cui essa viene consegnata in copia, unitamente al documento di valutazione di cui sopra.

I moduli sono concepiti in modo da poter essere utilizzati per impieghi tra loro assai diversi, e non tutti i punti in essi contenuti si adatteranno ai singoli casi. Nel caso di impieghi di laboratorio implicanti MOGM disegnati per terapia genica, nei formulari si dovrà indicare la linea di *packaging* utilizzata come ricevente, il vettore virale (o il plasmide), se utilizzato, ed il gene terapeutico inserito. Per gli impieghi clinici di tali MOGM è stato predisposto un modulo separato (mod. notifica impiego

MOGM applicazioni cliniche terapia genica).

Per quanto riguarda le autorizzazioni, solo per impieghi di classe 2 è previsto un regime di silenzio/assenso, con termine di 60 giorni. Se però sono già stati autorizzati presso lo stesso impianto impieghi di classe più elevata, gli impieghi di classe 2 possono iniziare subito dopo la notifica. Impieghi di classe 3 e 4 devono comunque attendere esplicita autorizzazione scritta, che il Ministero della Salute rilascerà entro 60 o 90 giorni, a seconda che presso l'impianto in cui si intende eseguirli siano già stati autorizzati o meno impieghi della stessa classe o di una classe superiore. Tutti i termini temporali decorrono dalla data di ricevimento, da parte del Ministero della Salute, della notifica di impiego completa di attestato di pagamento della relativa tariffa e si intendono sospesi durante i periodi in cui il Ministero è in attesa di ulteriori informazioni eventualmente richieste.



IMPIEGHI NOTIFICATI FINO AL 2009 IN ITALIA

Figura. 3 - Situazione degli impieghi notificati fino al 2009 in Italia

Ulteriori obblighi dell'utilizzatore

Per tutta la durata dell'impiego confinato, è responsabilità dell'utilizzatore (art 6, comma 1, lettera a) assicurarsi che siano pienamente applicate le misure di contenimento e le altre misure di protezione specificate nell'Allegato IV per la classe assegnata all'impiego confinato, nonché conservare i quaderni (o i file) in cui vengono registrate le operazioni eseguite (art. 6, comma 1, lettera b).

L'utilizzatore dovrà inoltre riesaminare periodicamente (annualmente per impieghi di classe 3 e 4 e almeno ogni 3 anni per impieghi di classe 1 e 2) la valutazione della classe di impiego e redigere un documento di riesame che dovrà essere consegnato al titolare dell'impianto. Altrettanto avviene nelle occasioni indicate all'art. 6, comma 2. Per impieghi di classe 3 e 4, l'utilizzatore dovrà inviare al Ministero della Salute una relazione in proposito con cadenza annuale (mod. relazione annuale impiego MOGM).

Al verificarsi di un incidente, spetta all'utilizzatore, poiché è colui in grado di valutare le conseguenze di un eventuale rilascio accidentale di MOGM, informare immediatamente, per iscritto, il Ministero della Salute (art. 16, comma 1). La comunicazione va estesa alle altre Autorità indicate nel medesimo comma nel caso in cui, in conseguenza dell'incidente, si verifichi un rilascio di MOGM al di fuori della zona utilizzata per l'impiego confinato.

Scadenza e rinnovo dell'autorizzazione all'impiego confinato di MOGM

Il notificante alla scadenza dell'autorizzazione di un impiego confinato del MOGM autorizzato deve interrompere le attività. Il notificante che intende proseguire nell'impiego ha l'obbligo di richiedere il rinnovo dell'autorizzazione.

A tale scopo dovrà inviare domanda al Ministero della Salute entro i 6 mesi che precedono la data di scadenza, fornendo contestualmente le seguenti informazioni:

A) se si tratta del primo rinnovo, in rapporto all'uso confinato autorizzato in precedenza:

- descrivere in dettaglio qualunque variazione nella costruzione del MOGM
- descrivere in dettaglio qualunque variazione nelle condizioni di uso (es. volume totale)
- descrivere in dettaglio qualunque incidente avvenuto negli anni di uso confinato autorizzato, con la valutazione dell'efficacia delle misure di sicurezza e di decontaminazione messe in atto fornire una aggiornata valutazione del rischio dell'impiego confinato;
- indicare per quanto tempo è richiesto il rinnovo;

B) se si tratta di un rinnovo successivo:

- fornire la storia dei cambiamenti del MOGM intercorsi e tutte le altre informazioni di cui al punto a).

Nel caso in cui le variazioni proposte e/o le condizioni d'uso e di sicurezza applicate non siano adeguate per consentire che l'impiego confinato continui, sarà necessario procedere ad una nuova autorizzazione.

Tariffe

Con Decreto del Ministro per la Salute 2 Maggio 2001 (G.U. del 5 Maggio 2001) vengono fissate le tariffe da versare all'atto della presentazione di ciascuna notifica. Perché la notifica inizi il suo iter di valutazione è necessario infatti che ad essa sia allegata ricevuta dell'avvenuto pagamento sul conto corrente postale 58299009 intestato alla sezione della tesoreria provinciale di Viterbo.

La tariffa è dovuta una sola volta per le diverse sezioni di uno stesso impianto, purché soddisfino le condizioni specificate all'art. 4 del citato decreto ministeriale. Anche nel caso di impieghi di MOGM che sfruttano uno stesso sistema ospite/vettore per diversi inserti, o uno stesso sistema vettore/inserto in diversi ospiti, questi impieghi possono essere considerati parti di una stessa notifica di impiego, con pagamento di una sola tariffa.

ULTERIORE NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Il D. Lgs 81/08 ovvero il Testo unico sulla salute e la sicurezza sul lavoro e sue modifiche ed integrazioni D. Lgs 106/09, è l'attuazione dell'art.1 della Legge n.123 del 3 agosto 2007 rappresenta un traguardo importante per la tutela della salute sul posto di lavoro.

La novità del Testo Unico sta innanzi tutto nel principio di fondo che lo ispira ossia nella ferma volontà di un riordino, armonico e uniforme, del complesso disorganico delle leggi promulgate negli ultimi cinquant'anni in materia di tutela del lavoro. Tali normative risultavano spesso contraddittorie fra loro e non sufficienti alla tutela dei lavoratori, mentre il nuovo testo unico ne integra i deficit con nuove norme, allarga il campo di applicazione a qualsiasi tipologia di lavoratore e parifica il settore pubblico e quello privato, in modo conforme alla Costituzione italiana e alle direttive europee, tenendo conto delle autonomie regionali e degli statuti speciali.

STRUTTURA DEL DECRETO LEGISLATIVO 81 / 08 (GU N. 101 DEL 30-04-08)			
TITOLO I	Disposizioni generali	Art. 001-061	Allegato da I a III
TITOLO II	Luoghi di lavoro	Art. 062-068	Allegato IV
TITOLO III	Attrezzature e DPI	Art. 069-087	Allegato da V a IX
TITOLO IV	Cantieri temporanei o mobili	Art. 088-160	Allegato da X a XXIII
TITOLO V	Segnaletica di sicurezza	Art. 161-166	Allegato da XXIV a XXXII
TITOLO VI	Mov. manuale dei carichi	Art. 167-171	Allegato da XXXIII
TITOLO VII	Attrezzature con videoterminali	Art. 172-179	Allegato da XXXIV
TITOLO VIII	Agenti fisici	Art. 180-220	Allegato da XXXV a XXXVII
TITOLO IX	Sostanze pericolose	Art. 221-265	Allegato da XXXVIII a XLIII
TITOLO X	Esposizione ad agenti biologici	Art. 266-286	Allegato da XLIV a XLVIII
TITOLO XI	Protezione da atmosfere esplosive	Art. 287-297	Allegato da XLIX a LI
TITOLO XII	Disposizioni penali e procedura	Art. 298-303	
TITOLO XII	Disposizioni transitorie	Art. 304-306	

Tabella. 4

Il decreto è diviso in dodici titoli e cinquantuno allegati (Tabella 4). Le disposizioni e le definizioni generali comuni a tutte le attività lavorative nell'ambito dell'organizzazione di un datore di lavoro sono contenute nel Titolo I. I successivi sono i "Titoli speciali" ognuno dei quali tratta un settore di attività e una tipologia di rischio sul lavoro.

La normativa premia e incentiva l'osservanza e la diffusione di una cultura della sicurezza, sin dalla scuola, in cui viene inserita come materia. Il decreto stabilisce e definisce, infatti, gli organi istituzionali preposti a fornire assistenza ai datori di lavoro

e a individuare soluzioni tecniche, organizzative, formative e di controllo.

Di fatto il provvedimento potenzia il sistema di vigilanza, il ruolo dei rappresentanti dei lavoratori, cui assicura progetti formativi e corsi qualificanti.

Istituisce il SINP (sistema informativo nazionale per la prevenzione) a esaudire l'esigenza di un'informazione centralizzata, ufficiale e costantemente aggiornata sia per il datore di lavoro che per il lavoratore.

Il Titolo X del decreto (Figura. 4) diviso in quattro Capi, regola tutte le attività nelle quali vi è rischio di esposizione ad agenti biologici.

Il Capo primo è dedicato al complesso di definizioni e classificazioni in quattro classi di rischio degli agenti biologici, alle procedure di autorizzazione e comunicazione agli organi di vigilanza, che il datore di lavoro che utilizzi tali agenti deve osservare.

Il Capo secondo definisce la valutazione del rischio, le misure tecniche, organizzative, procedurali e di emergenza nell'impiego di tali agenti, le misure igieniche e di prevenzione specifiche per strutture sanitarie o veterinarie, i laboratori, stabulari e i processi industriali e infine gli obblighi di formazione e di informazione dei lavoratori.

Il Capo terzo regola la sorveglianza sanitaria a cui sono sottoposti i lavoratori esposti ad agenti biologici assegnando l'obbligo al datore di lavoro di provvedere alla prevenzione e al controllo sanitario tramite l'ausilio del medico competente e di istituire e aggiornare un registro dei lavoratori esposti ad agenti biologici di classe 3 e 4 garantendo l'accesso ai dati del rappresentante per la sicurezza e al medico competente.

Infine il Capo quarto regola le sanzioni a carico di datori di lavoro, dirigenti, preposti, medici competenti, lavoratori nel caso di specifiche inadempienze di loro competenza.

Il Titolo X è integrato dagli Allegati dal n. XLIV al n. XLVIII i quali, circostanziano le attività lavorative che possono comportare la presenza di agenti biologici, elencano gli agenti biologici classificati, presentano le specifiche misure e livelli di contenimento e sull'uso degli agenti biologici nei processi industriali.

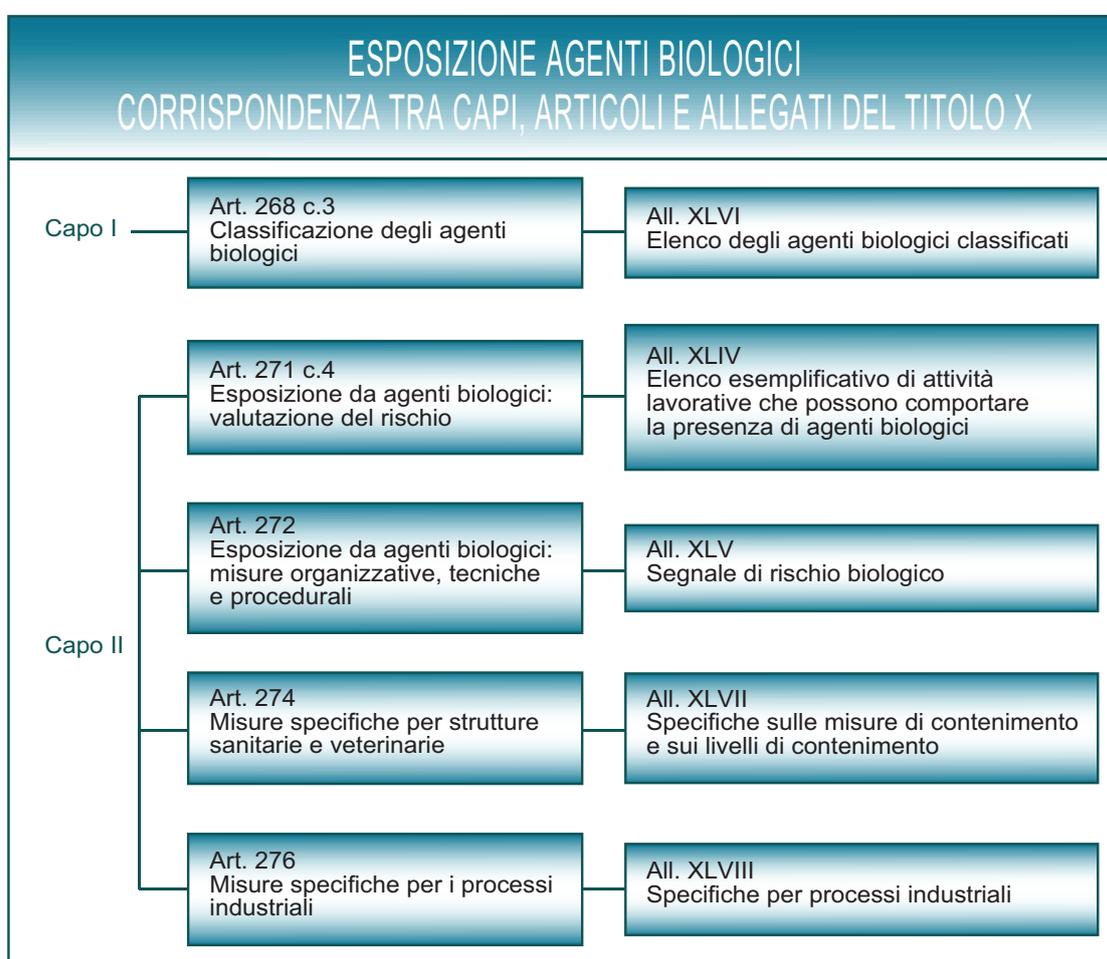


Figura. 4

In data 21.05.2009, al D. Lgs 81/08 sono state apportate modifiche con il Decreto Legislativo 3 agosto 2009, n. 106. Disposizioni integrative e correttive del Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n. 81, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. Tale decreto è entrato in vigore dal 20 agosto 2009.

Valutazione del rischio dell'impiego confinato

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.

Un **agente biologico** è definito, secondo la normativa vigente (Direttiva 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:

- **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.

Un **microrganismo geneticamente modificato** (MOGM), secondo la Direttiva 2009/41/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*”.

Nell'Allegato I (parte A) della suddetta direttiva sono contenute informazioni sulle tecniche da considerare idonee all'ottenimento di un microorganismo geneticamente modificato:

- 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.

Nella seconda parte dell'Allegato I (parte B) vengono indicate invece le tecniche non considerate come risultato di modificazioni genetiche:

- fecondazione *in vitro*;
- processi naturali quali trasduzione, trasformazione, coniugazione;
- induzione della poliploidia.

Un MOGM quindi è costituito da un *organismo ospite*, nel quale l'informazione genica viene inserita, un *organismo donatore*, dal quale viene ottenuta l'informazione, da un *vettore* che trasferisce l'informazione tra questi organismi e da un *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.

Ricadono sotto la nuova normativa tutte le attività che comportano l'uso di MOGM, inclusa la semplice conservazione (stoccaggio) di ceppi o linee cellulari.

Il processo di valutazione del rischio indicato nel D. Lgs 206/01 si basa sull'attuazione di due procedure. La prima procedura prevede l'identificazione delle caratteristiche potenzialmente nocive del MOGM (rischio), l'attribuzione al MOGM di una classe iniziale (classi da 1 a 4), sulla base degli effetti nocivi potenziali e la valutazione della probabilità con cui gli effetti nocivi possono verificarsi sia su soggetti umani sia sull'ambiente, tenendo conto della natura e della portata del lavoro svolto e delle misure di contenimento adottate sulla base della classificazione iniziale del MOGM. La seconda procedura prevede la classificazione definitiva del MOGM, l'individuazione delle misure di contenimento concrete per garantire la sicurezza durante l'attività implicante l'uso di microrganismi geneticamente modificati.

Il livello di classificazione definito mediante la valutazione del rischio determina i requisiti relativi al contenimento per le attività connesse ai MOGM, conformemente all'Allegato IV della Direttiva.

Le due procedure da seguire per effettuare una corretta valutazione del rischio sono specificate nel Decreto Ministeriale

25 settembre 2001.

Gli elementi per la valutazione del rischio specificati nei paragrafi 1 e 2 dell'Allegato III comprendono tra l'altro la valutazione degli effetti potenzialmente nocivi per la salute umana e l'ambiente. Sono ritenuti potenzialmente nocivi quegli effetti suscettibili di causare malattie, vanificarne la profilassi o la terapia e promuovere l'insediamento e/o la diffusione nell'ambiente di microrganismi che possono produrre effetti negativi su popolazioni naturali o effetti dannosi in seguito al trasferimento di geni in altri organismi.

La valutazione comporta l'analisi dei rischi collegati agli effetti potenzialmente nocivi per ciascuna attività e la loro attribuzione alle diverse classi definite nell'articolo 5, tenendo conto sia della natura che della portata delle operazioni per stabilire quali siano le attrezzature di contenimento finale necessarie. Il grado di rischio connesso agli impieghi confinati e ai processi di costruzione di microrganismi geneticamente modificati (MOGM) dipende dalla gravità degli effetti potenzialmente nocivi per la salute umana o l'ambiente e dalla possibilità che questi effetti si verifichino realmente. In sede di valutazione del rischio si considera l'esposizione di soggetti umani o dell'ambiente ai MOGM, durante le normali operazioni svolte in una struttura di impiego confinato o in caso di dispersione accidentale nell'ambiente. Il livello di classificazione, definito mediante la valutazione del rischio, determina i requisiti relativi al contenimento per le attività connesse ai MOGM, conformemente all'Allegato IV (Figura. 5).

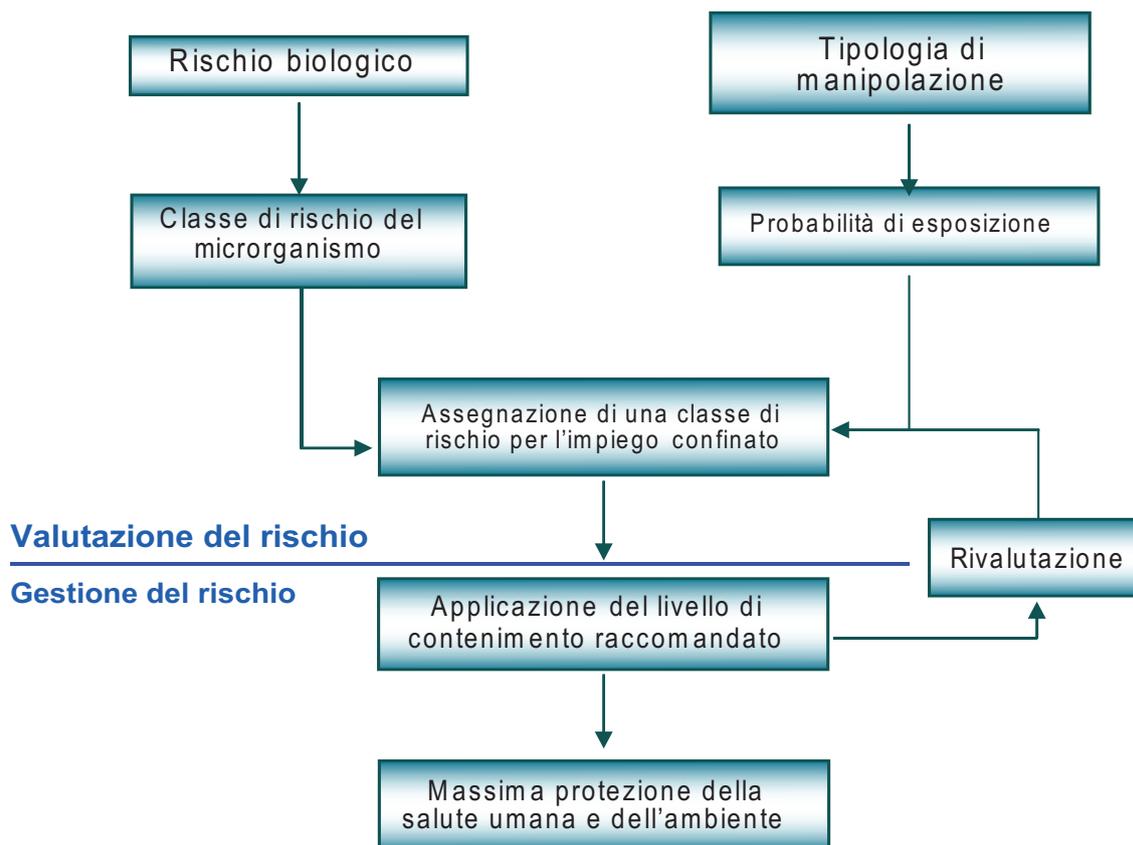


Figura. 5 – Lo schema sintetizza la procedura della valutazione del rischio e della sua gestione

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DELL'IMPIEGO CONFINATO

La valutazione di cui all'articolo 5, comma 2, si deve basare sui seguenti elementi:

PROCEDURA 1

A. Individuazione di tutti gli effetti potenzialmente nocivi dell'impiego confinato

L'identificazione delle caratteristiche potenzialmente nocive del MOGM, determinate dalla modificazione genetica o da eventuali cambiamenti degli elementi tipici dell'organismo ricevente.

Sono considerati effetti potenzialmente nocivi:

- affezioni degli esseri umani, inclusi gli effetti tossici o allergici;
- malattie degli animali o delle piante;
- effetti negativi dovuti all'impossibilità di curare la malattia o di predisporre un'efficace profilassi;
- effetti negativi dovuti alla colonizzazione o alla diffusione nell'ambiente;

- effetti negativi dovuti al trasferimento per via naturale ad altri organismi del materiale genetico inserito.

Tali informazioni si evidenziano da una disamina delle singole caratteristiche biologico-molecolari dell'organismo ricevente, dell'organismo donatore, dell'inserito, del sito di inserzione e del relativo vettore. È importante rilevare che la modificazione genetica di un microrganismo può modificare le sue caratteristiche biologiche e quindi può diminuire, aumentare o lasciare inalterato il potenziale di danno di un MOGM sulla salute umana e sull'ambiente.

Organismo ricevente:

- la patogenicità e virulenza, infettività, allergenicità, tossicità e possibilità di fungere da vettore di agenti patogeni;
- la natura dei vettori indigeni e degli agenti avventizi laddove sussiste il rischio di una mobilitazione del materiale genetico inserito;
- la frequenza della mobilitazione del materiale genetico inserito, se presente;
- la natura e stabilità delle eventuali mutazioni disabilitanti;
- le eventuali modificazioni genetiche precedenti;
- la gamma degli organismi ospiti, se pertinenti;
- gli eventuali tratti fisiologici significativi che potrebbero essere alterati nel MOGM finale o la relativa stabilità, se pertinenti;
- l'habitat naturale e la distribuzione geografica;
- la partecipazione significativa in processi ambientali naturali (ad es. fissazione dell'azoto, regolazione del pH);
- l'interazione con altri organismi nell'ambiente e gli effetti su di essi, incluse le eventuali caratteristiche di competitività, patogenicità o simbiosi;
- la capacità di formare strutture di sopravvivenza (ad es. spore o sclerozi).

Inserito:

- l'identità e le funzioni specifiche dell'inserito (geni);
- il livello di espressione del materiale genetico inserito;
- l'origine del materiale genetico, l'identità dell'organismo o degli organismi donatori e loro caratteristiche, se pertinenti;
- la storia di eventuali modificazioni genetiche precedenti;
- l'ubicazione del materiale genetico inserito (possibilità di attivazione/disattivazione di geni dell'organismo ospite a seguito dell'inserzione)

Vettore:

- la natura e l'origine dei vettori;
- la struttura e la quantità dell'acido nucleico del vettore e/o del donatore che rimane nel costrutto finale del microrganismo modificato;
- la frequenza di mobilitazione del vettore inserito (se presente nel MOGM finale) e/o la capacità di trasferimento di materiale genetico.

Organismo donatore:

Devono essere prese in considerazione per esperimenti di fusione o esperimenti "shotgun" dove l'inserito non è ben caratterizzato:

- la patogenicità, virulenza, infettività, tossicità e possibilità di fungere da vettore di agenti patogeni;
- la natura dei vettori indigeni:
 - ✓ sequenza;
 - ✓ frequenza di mobilitazione e specificità;
 - ✓ presenza di geni che conferiscono resistenza a sostanze antimicrobiche compresi gli antibiotici;
- la gamma degli organismi ospiti.

Valutazione dell'incidenza del MOGM sulla salute umana e sull'ambiente

Per quanto attiene al microrganismo geneticamente modificato ottenuto è necessario valutare gli effetti potenzialmente nocivi che può avere sulla salute umana e sull'ambiente.

Gli aspetti che vanno presi in considerazione in ordine alla salute umana sono:

- gli effetti tossici o allergenici attesi correlati al MOGM e/o ai suoi prodotti metabolici;
- il confronto della patogenicità del MOGM con quella del ricevente oppure, se pertinente, dell'organismo parentale;
- la capacità di colonizzazione attesa;
- la possibilità che il microrganismo sia patogeno per soggetti umani immunocompetenti;
- le malattie provocate dal MOGM e i meccanismi di trasmissione;
- il livello di invasività e la virulenza;

- la dose infettiva;
- i possibili cambiamenti della via di infezione o della specificità tissutale;
- la possibilità di sopravvivenza del MOGM al di fuori di un organismo umano;
- la stabilità biologica;
- lo spettro di resistenze agli antibiotici;
- l'allergenicità;
- la tossinogenicità;
- la disponibilità di terapie e misure profilattiche adeguate.
- gli ecosistemi nei quali il microrganismo in questione potrebbe essere involontariamente rilasciato dalla struttura di impiego confinato;
- l'attesa circa la capacità di sopravvivenza e moltiplicazione e la portata della disseminazione del microrganismo modificato negli ecosistemi identificati;
- l'anticipazione delle conseguenze dell'interazione tra il microrganismo modificato e gli organismi o i microrganismi che potrebbero entrare in contatto in caso di immissione accidentale nell'ambiente;
- gli effetti noti o prevedibili sulle piante e sugli animali quali patogenicità, tossicità, allergenicità, trasmissione di agenti patogeni, modificazione nella resistenza agli antibiotici, alterazione del tropismo o della specificità per organismi ospiti, colonizzazione;
- il coinvolgimento noto o prevedibile in processi biogeochimici.

B. Caratteristiche dell'impiego confinato

L'analisi di valutazione del rischio, in una prima fase si basa sull'identificazione delle potenziali caratteristiche nocive del MOGM esaminando i rischi associati al ricevente, all'organismo donatore, al vettore ed all'eventuale inserto; a questo processo deve seguire una prima classificazione dell'impiego confinato.

Classificazione iniziale del MOGM

I paragrafi da 3 a 5 dell'Allegato III specificano che la prima fase del processo di valutazione del rischio di un MOGM è l'identificazione delle sue potenziali caratteristiche nocive e una prima classificazione mediante l'identificazione dei rischi associati al ricevente, all'organismo donatore se di pertinenza, al vettore e all'eventuale inserto. A tale scopo può essere utile tenere conto oltre che delle caratteristiche generali specificate per la classe 1 al paragrafo 4 dell'Allegato III anche degli opportuni ed aggiornati schemi di classificazione nazionali e internazionali (inclusa la Direttiva 2000/54/CE). Le corrispondenti misure di contenimento e le altre misure di protezione specificate nell'Allegato IV possono fungere da riferimento per stabilire se occorrono provvedimenti più severi di contenimento e protezione per limitare gli effetti nocivi identificati.

Per stabilire il livello di rischio dei danni, dovuti alle proprietà nocive del MOGM, occorre valutare la gravità del danno e le altre caratteristiche biologiche (ad esempio le mutazioni disabilitanti) suscettibili di limitarne la probabilità. La gravità degli effetti nocivi deve essere stimata a prescindere dalla probabilità con cui essi si potrebbero verificare realmente. Per determinare la gravità dei possibili danni occorre valutare le eventuali conseguenze e non la probabilità del verificarsi del danno. Ad esempio, nel caso di un agente patogeno, occorre stimare la gravità della malattia partendo dal presupposto che la specie suscettibile è stata effettivamente infettata. L'attribuzione del MOGM ad una classe iniziale implica una valutazione della gravità in questo senso. Gli schemi di classificazione, come quello contenuto nella Direttiva 2000/54/CE, tengono conto della gravità delle conseguenze. Tuttavia molti schemi sono basati solo su considerazioni relative o alla salute umana o all'ambiente. Occorre dunque valutare la gravità degli effetti nocivi del MOGM in questione tenendo conto delle due dimensioni.

C. Gravità degli effetti potenzialmente nocivi

Il livello di rischio dei danni dovuti alle proprietà nocive del MOGM viene stabilito dalla valutazione della gravità del danno e dalle altre caratteristiche biologiche (ad es. mutazioni disabilitanti) suscettibili di limitarne la probabilità di accadimento. L'entità degli effetti nocivi deve essere valutata a prescindere dalla probabilità con cui essi si possano verificare nella realtà, quindi per realizzare una stima della gravità è necessario valutare le possibili conseguenze in modo distinto dalla probabilità del verificarsi del danno.

Ad esempio, nel caso di un agente patogeno, occorre stimare la gravità della malattia partendo dal presupposto che la specie suscettibile possa essere effettivamente infettata. L'attribuzione del MOGM ad una classe iniziale, implica una valutazione della gravità in questo senso. Gli schemi di classificazione, come quello contenuto nella Direttiva 2000/54/CE, tengono conto della gravità delle conseguenze. Occorre dunque valutare la gravità degli effetti nocivi del MOGM in questione tenendo conto delle due dimensioni.

D. Probabilità che gli effetti potenzialmente nocivi si verifichino

I fattori da valutare nel determinare il grado di probabilità che si verifichi un evento dannoso riguardante un determinato MOGM sono il livello e la natura dell'esposizione di soggetti umani o dell'ambiente ad esso.

In diversi casi l'esposizione svolge un ruolo fondamentale nella valutazione del rischio, poiché spesso è determinante nel verificarsi dell'eventuale effetto dannoso. La probabilità di esposizione di soggetti umani o dell'ambiente ad un determinato MOGM è correlata al tipo di attività effettuate e alle condizioni di contenimento applicate corrispondenti alla classificazione iniziale.

Al fine di stimare la probabilità di un'esposizione di soggetti umani o dell'ambiente ad un MOGM è necessario inoltre va-

lutare la natura e la portata delle attività lavorative svolte, senza dimenticare che tali fattori influenzano anche la scelta delle procedure di gestione del rischio.

Natura delle attività da svolgere

Il grado di rischio e l'adozione di misure di protezione per ridurre tale rischio ad un livello adeguato, dipendono dalla natura delle attività da svolgere, poiché esse determinano l'esposizione di soggetti umani e dell'ambiente al rischio e dunque la possibilità che si verifichi un danno. In funzione della natura delle attività da svolgere viene utilizzata una delle tabelle specificate nell'Allegato IV che definiscono le misure adeguate di contenimento e di protezione. In pratica, per i lavori svolti in laboratorio, dove l'influenza delle procedure standard sull'esposizione è ben nota, è improbabile che venga richiesta una valutazione dettagliata del rischio di ogni singola procedura, a meno che non si utilizzi un organismo estremamente pericoloso. Tuttavia potrebbero essere necessarie considerazioni più specifiche per procedure non routinarie o per procedure che potrebbero avere implicazioni significative per il livello di rischio, come nel caso di processi in cui viene generato aerosol.

Concentrazione e portata

La densità di una coltura può comportare il rischio di esposizione ad alte concentrazioni di un particolare MOGM, soprattutto nelle fasi a valle di un processo. Occorre dunque valutare attentamente gli effetti della concentrazione del MOGM sulla probabilità che si verifichi un evento dannoso. Anche la portata delle operazioni è un fattore da considerare in sede di valutazione del rischio. Tale fattore può essere espresso in termini di volume assoluto di un'unica operazione oppure in termini di frequenza di un determinato processo ripetitivo, poiché entrambi possono concorrere ad aumentare la possibilità di esposizione se dovessero fallire le misure di contenimento e protezione e quindi influire sulla probabilità che si verifichi un evento dannoso. Sebbene le operazioni su vasta scala non comportino necessariamente un livello di rischio più elevato, esse potrebbero comunque aumentare la possibilità di esposizione sia in termini di numero di soggetti umani sia di quantità di esposizione dell'ambiente in caso di cattivo funzionamento delle misure di contenimento. Sulla base della portata delle operazioni si sceglie nell'Allegato IV la tabella che risulta essere più adeguata all'applicazione delle misure di contenimento e protezione.

Condizioni relative alle colture

In molte attività di impiego confinato le colture vengono realizzate in ambiente rigorosamente controllato. Il tipo e la configurazione dei contenitori o di altre attrezzature utilizzate per la crescita delle colture influisce sul grado di rischio per la salute umana e l'ambiente.

Risulta necessario inoltre prendere in considerazione l'affidabilità e le possibili anomalie delle attrezzature, poiché eventuali malfunzionamenti possono comportare un aumento del rischio espositivo, a tal fine è importante prevedere eventuali misure di contenimento supplementari quando la probabilità di possibili disfunzioni sia elevata.

Procedure operative standard relative al personale che svolge lavori a contatto con le colture di MOGM, quali centrifugazione o sonicazione, hanno una influenza di rilievo sull'efficacia delle misure di contenimento utilizzate.

Le condizioni colturali sono esse stesse misure di contenimento fisico, e le misure biologiche e chimiche utilizzate per proteggere i lavori svolti in laboratorio possono contribuire in maniera significativa al rafforzamento delle misure di contenimento. Una possibile misura biologica di contenimento è l'uso di mutanti auxotrofi per i quali occorrono fattori di crescita specifici. Esempi di misure di contenimento chimico sono le soluzioni disinfettanti mantenute in sistemi di drenaggio.

L'intensità e la natura dell'esposizione dell'ambiente e l'eventuale presenza di bioti che possono subire effetti negativi se esposti al MOGM in questione sono elementi ambientali importanti.

Ambiente potenzialmente esposto

Nella valutazione del rischio, in conformità a quanto definito dalla normativa di riferimento, è necessario considerare anche le caratteristiche ambientali delle aree potenzialmente esposte e l'incidenza che queste possono avere sul prodursi di eventuali effetti dannosi.

In genere l'ambiente potenzialmente esposto viene identificato con il luogo di lavoro e con l'area immediatamente circostante. Tuttavia, sulla base delle caratteristiche specifiche dell'impiego confinato e dell'impianto, nel quale avvengono le attività lavorative, potrebbe essere opportuno considerare un ambiente più ampio.

La portata dell'esposizione dell'ambiente può dipendere dalla natura e dalla portata dell'attività svolta, ma occorre tenere in considerazione anche tutte le possibili modalità di trasmissione nell'ambiente circostante. In questo caso potrebbe trattarsi di modalità fisiche (tubature di scarico locali, corsi d'acqua, smaltimento dei rifiuti, movimenti delle correnti d'aria) e vettori biologici (movimento di animali e insetti infettati).

Presenza di specie suscettibili

La possibilità che si verifichi realmente un danno dipende anche dall'eventuale presenza di specie suscettibili (uomo, animali o piante) nell'ambiente potenzialmente esposto.

Ambiente favorevole alla sopravvivenza del MOGM

La possibilità che il MOGM possa sopravvivere e perdurare nell'ambiente è un fattore determinante in sede di valutazione del rischio.

Effetti sull'ambiente fisico

Occorre anche valutare gli effetti dannosi connessi a un MOGM sia diretti, sia indiretti dovuti ad un'alterazione significativa delle caratteristiche fisico-chimiche e/o dell'equilibrio ecologico delle componenti del suolo o dell'acqua nell'ambiente esposto.

PROCEDURA 2

1. Classificazione definitiva e determinazione delle misure di contenimento

Una volta esaminate tutte le potenziali caratteristiche dannose in termini di gravità e di probabilità, tenendo in debita considerazione gli effetti delle misure di contenimento e di protezione indicate nella classificazione iniziale dell'organismo ricevente, si può procedere alla classificazione definitiva e alla determinazione delle misure di contenimento per il MOGM in questione. Per classificare il MOGM e determinare le relative misure di confinamento, in via definitiva, occorre rivedere la classificazione iniziale per stabilirne la correttezza, tenendo presente le attività e le caratteristiche delle operazioni proposte. Da un confronto tra la classificazione iniziale e le relative misure di contenimento da un lato, e la classe e le misure di contenimento definitive dall'altro, si possono ottenere tre risultati differenti:

- si constatano effetti negativi che non sono stati presi adeguatamente in considerazione nella classificazione iniziale e che non sarebbero opportunamente limitati dalle misure di contenimento provvisorie stabilite con la procedura 1. Occorre dunque applicare ulteriori misure di contenimento e possibilmente rivedere la classificazione dell'attività;
- la classificazione iniziale era corretta e le misure di contenimento che ne derivano sono adatte a prevenire o minimizzare i danni alla salute umana o all'ambiente;
- la classificazione iniziale è di livello superiore rispetto a quanto necessario per l'attività svolta e di conseguenza sarebbe opportuno utilizzare una classificazione inferiore con relative condizioni di contenimento.

2. Conferma dell'adeguatezza delle misure di contenimento definitive

Una volta stabilite la classificazione e le condizioni di contenimento definitive, occorre rivalutare il livello dell'esposizione di soggetti umani e dell'ambiente (procedura 1). Ne dovrebbe risultare una conferma dell'accettabilità del grado di probabilità degli effetti nocivi, vista la natura e la portata delle operazioni e le condizioni di contenimento proposte. A questo punto il processo di valutazione del rischio è concluso.

Conformemente all'articolo 6, paragrafo 2 della Direttiva, se la natura o la portata dei lavori da svolgere cambiano in misura significativa, oppure se sono disponibili nuovi dati scientifici o tecnici, tali da inficiare la valutazione del rischio iniziale, quest'ultima deve essere rivista alla luce dei cambiamenti subentrati. Per tutelare la salute umana e l'ambiente occorre modificare immediatamente le condizioni di contenimento in base all'esito della nuova valutazione del rischio.

La classificazione e le misure di contenimento e protezione che, a seguito della valutazione del rischio sono ritenute necessarie per contenere in misura adeguata il MOGM durante le operazioni proposte, consentono di classificare l'attività di impiego confinato in quattro classi. L'Allegato IV della direttiva specifica le misure di contenimento e di protezione per ciascuna classe di impiego confinato.

Dalla classificazione delle attività di impiego confinato relative ai MOGM dipendono anche i requisiti di carattere amministrativo.

In caso di dubbio relativamente alla classificazione definitiva e alle condizioni di contenimento è consigliabile contattare l'autorità competente.

Terapie avanzate e medicinali innovativi

Le **terapie avanzate**, in particolare la terapia genetica, la terapia cellulare somatica e l'ingegneria tissutale, presentano nuove possibilità per il trattamento delle malattie umane. I medicinali per terapie avanzate sono nuovi e complessi e sono disciplinati da una regolamentazione adeguata per salvaguardare la sanità pubblica.

Per **medicinale per terapia avanzata** si intende uno dei seguenti medicinali ad uso umano: medicinale di terapia genetica, medicinale di terapia cellulare somatica, prodotto di ingegneria tissutale.

Prodotto di ingegneria tissutale: prodotto che contiene o consiste di cellule o tessuti prodotti dall'ingegneria cellulare o tissutale e che è presentato come avente proprietà atte a rigenerare, riparare o sostituire un tessuto umano, oppure che viene utilizzato o somministrato ad esseri umani a tal fine. Questo tipo di prodotto può contenere cellule o tessuti d'origine umana o animale, o entrambe. Il prodotto può anche contenere prodotti cellulari, biomolecole, biomateriali, sostanze chimiche, supporti o matrici.

Medicinale per terapie avanzate combinate: medicinale per terapie avanzate che contiene, come parte integrante del prodotto uno o più dispositivi medici ai sensi della Direttiva 93/42/CEE, o uno o più dispositivi medici impiantabili attivi ai sensi della Direttiva 90/385/CEE. La sua parte cellulare o tissutale deve contenere cellule o tessuti vitali, o la sua parte cellulare o tissutale che contiene cellule o tessuti non vitali deve essere capace di agire sul corpo umano con un'azione che possa essere considerata primaria rispetto a quella dei dispositivi in questione.

MEDICINALI SPERIMENTALI PER TERAPIA GENICA

I medicinali sperimentali per terapia genica, così come definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono quelli usati *in vivo* per modificare geneticamente cellule somatiche umane oppure quelli costituiti da acidi nucleici, da microrganismi geneticamente modificati o da cellule autologhe, allogene o xenogene modificate geneticamente *ex vivo*. Tali prodotti sono usati per il trattamento, la prevenzione o la diagnosi di malattie nell'uomo.

Le applicazioni di terapia genica *in vivo* o *ex vivo* presentano diverse caratteristiche e limiti:

terapia genica *in vivo*: I geni clonati sono trasferiti direttamente nei tessuti del paziente. È l'unica possibilità di terapia genica per tessuti in cui le singole cellule non possono essere coltivate *in vitro* in numero sufficiente (es. cellule cerebrali) e/o quest'ultime non possono essere estratte o reimpiantate nel paziente.

Limiti:

Non esiste un modo per selezionare e amplificare le cellule che acquisiscono ed esprimono il gene esogeno, quindi il successo dipende dal grado di efficienza del trasferimento e dell'espressione del gene.

terapia genica *ex vivo*: Metodo applicabile solo a tessuti che possono essere prelevati dal paziente modificati geneticamente *in vitro* e reintrodotti nel paziente dove attecchiscono e sopravvivono per un lungo periodo di tempo (es. cellule del sistema ematopoietico, epiteliali).

Limiti:

Possibili fenomeni di rigetto da parte del sistema immunitario evitati dal normale utilizzo di cellule autologhe.

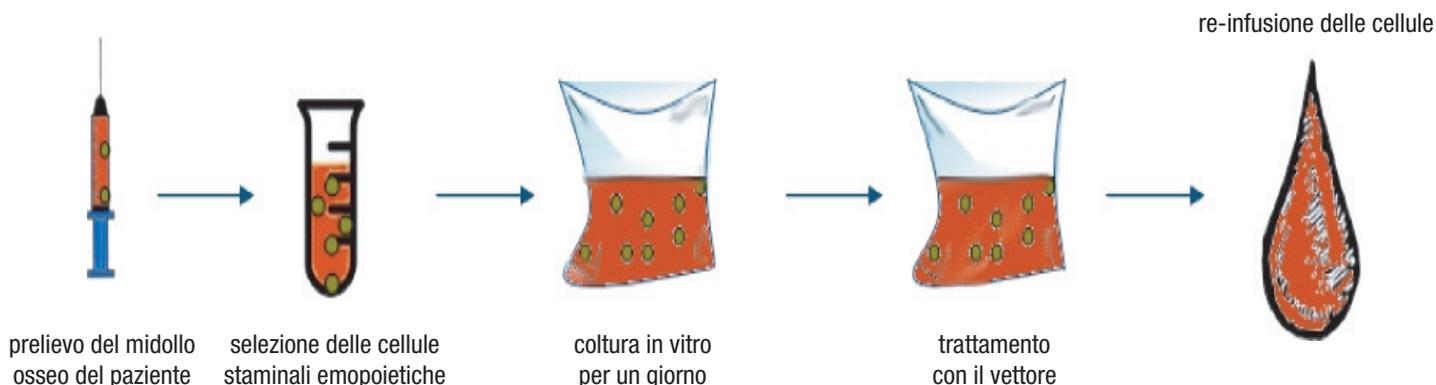


Figura. 6 - Schema di protocollo di terapia genica *ex vivo*

La scelta di uno o dell'altro approccio è condizionata da una serie di fattori, come la natura o la disponibilità delle cellule bersaglio e le caratteristiche della malattia da curare. Alcune cellule sono più facili da prelevare, come le cellule del sangue,

che possono anche essere manipolate e trattate *ex vivo*. Per altri organi, come il fegato, si può utilizzare un approccio *in vivo* nel quale il vettore contenente il transgene viene iniettato per via endovenosa e tramite il circolo sanguigno raggiunge il fegato.

La Tabella. 5 fornisce una panoramica dei tipi di medicinali sperimentali per terapia genica attualmente in uso.

ESEMPI DI MEDICINALE SPERIMENTALE PER TERAPIA GENICA	
Acidi nucleici liberi	di norma inseriti in plasmidi, somministrati come tali o con adiuvanti
Acidi nucleici complessati	plasmidi complessati con policationi, proteine, altri polimeri, oppure incapsulati in vettori non virali come liposomi, oppure veicolati da particelle colloidali
Vettori virali	derivati da adenovirus, retrovirus, virus adeno -associati, lentivirus, herpes virus, virus vaccinico; in alcuni casi competenti per la replicazione <i>in vivo</i> , ma di solito resi difettivi
Cellule geneticamente modificate	di norma sono cellule umane autologhe o allogeniche, a volte xenogeniche di origine microbiologica

Tabella. 5

Il medicinale sperimentale di terapia genica deve essere preparato e caratterizzato in modo tale da avere le informazioni chimico-molecolari-biologiche necessarie per una corretta valutazione del rapporto rischio-beneficio in relazione all'uso clinico proposto.

La terapia genica è particolarmente adatta ad alcune patologie:

- malattie infettive (causate da un singolo agente patogeno sia virale sia batterico);
- tumori (causati da errata divisione e proliferazione cellulare per attivazione di un oncogene o inattivazione di un oncosoppressore);
- malattie ereditarie (deficienze genetiche di un singolo prodotto genico o errata espressione di un gene);
- malattie del sistema immunitario (allergie, infiammazioni e malattie autoimmuni).

STRATEGIE OPERATIVE DELLA TERAPIA GENICA	APPLICAZIONI
Aumentare la quantità di un gene deficitario aggiungendone delle copie	Malattie causate da perdita funzionale di un gene. L'introduzione di copie aggiuntive del gene non alterato determina un aumento quantitativo del prodotto genico a livelli sufficienti per ripristinare il fenotipo normale
Killing selettivo delle cellule patologiche	Alcune forme tumorali. Alcuni geni possono essere indotti nella loro espressione in cellule tumorali in modo da causarne la morte. Il <i>killing</i> si distingue in: Diretto: i geni codificano per una tossina letale o per un pro-farmaco (molecola in grado di conferire suscettibilità a un determinato farmaco la cui somministrazione svolge azione sinergica e selettiva sulla cellula). Indiretto: geni immunostimolatori capaci di indurre o aumentare una risposta immunitaria contro la cellula cancerogena
Correzione selettiva della mutazione che altera la funzionalità genica	Difficile applicazione pratica anche se teoricamente attuabile sia a livello di sequenza genica sia a livello del suo trascritto di RNA messaggero
Inibizione selettiva dell'espressione genica	In cellule alterate che esprimono un nuovo prodotto genico come molecola alterata o aberrante, si può bloccare l'espressione intervenendo direttamente sul DNA, sull'RNA o sulla proteina

Tabella. 6

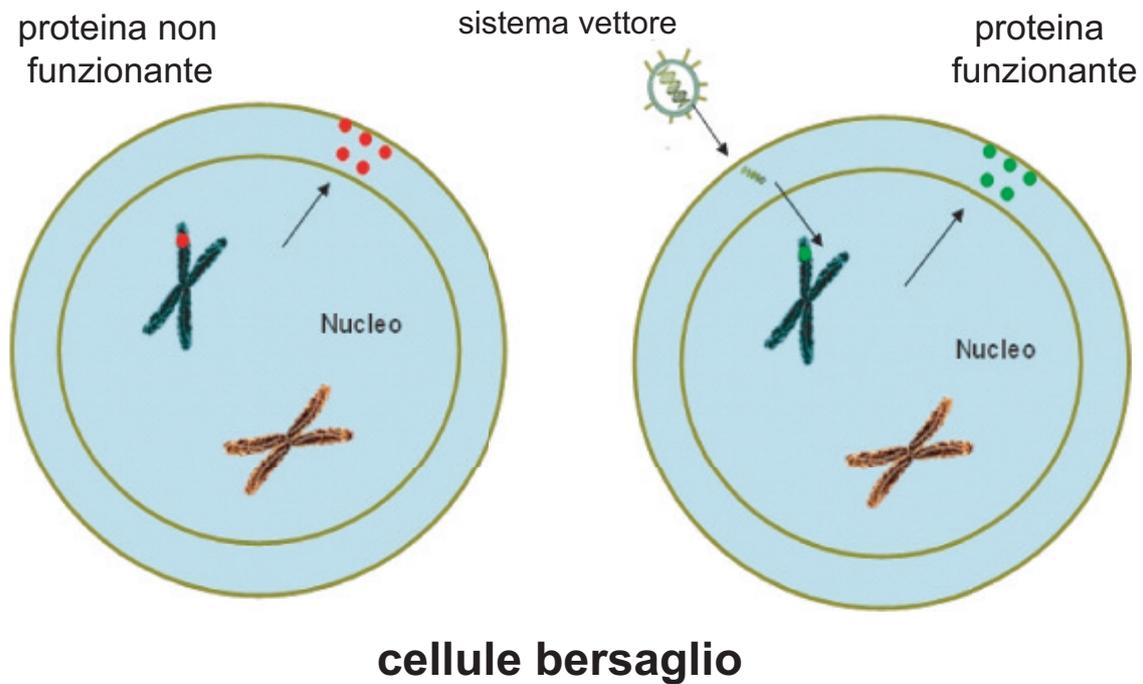


Figura. 7 - Principio di funzionamento della terapia genica

- **Efficienza elevata del transgene**
Il trasferimento del transgene alle cellule deve avvenire con un'efficienza elevata. Infatti, se la percentuale di cellule che riceve il transgene è bassa, non si avrà un esito terapeutico favorevole per la maggior parte delle patologie. L'efficienza di trasferimento è correlata sia alla tipologia dei vettori utilizzati per veicolare i transgeni che alle cellule bersaglio.
- **Livello di espressione del transgene**
Il livello di espressione del transgene deve essere appropriato rispetto a ciò che avviene a livello fisiologico. Una produzione troppo bassa non ha effetto terapeutico, una troppo alta potrebbe avere un effetto nocivo. Un ruolo fondamentale nell'espressione del transgene è svolto dal promotore scelto. Inoltre in alcuni casi è preferibile un'espressione costitutiva del transgene, mentre in altri casi potrebbe essere modulata "attivando" o "disattivando" il transgene al momento opportuno.
- **Permanenza del transgene**
Il nuovo materiale genetico introdotto deve poter essere mantenuto nella cellula a lungo termine, tranne nel caso in cui sia preferibile una sua presenza transitoria.
- **Risposta immunitaria**
La risposta immunitaria è un altro aspetto critico per l'efficacia di un intervento di terapia genica. Infatti, può manifestarsi una risposta immune contro il vettore per trasferimento genico o contro il transgene stesso, riconosciuto come estraneo. L'insorgere di una risposta di tipo immunitario può avere effetti anche molto gravi, limitando non solo l'efficacia della procedura terapeutica, ma mettendone anche a serio rischio la sicurezza. Una terapia genica di successo deve essere quindi in grado di evadere i meccanismi di difesa immunitaria tipici degli organismi complessi come l'uomo.
- **Sicurezza della pratica terapeutica**
La sicurezza della pratica terapeutica è un aspetto essenziale da considerare, nel caso di vettori di origine virale si deve essere certi dell'assenza di virus contaminanti patogeni o di possibilità residua di provocare malattia da parte del vettore. Inoltre nel caso di vettori che si integrano nei cromosomi è necessario valutare possibili effetti negativi per la presenza di nuovo materiale genetico all'interno del genoma delle cellule bersaglio.

Direttiva 2009/41/CE	Impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati
Regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 13 novembre 2007, sui medicinali per terapie avanzate e recante modifica della Direttiva 2001/83/CE e del Regolamento (CE) n. 726/2004	Il presente regolamento fissa norme per i medicinali per terapie avanzate che sono preparati industrialmente o nella cui fabbricazione intervenga un processo industriale e che devono essere commercializzati negli Stati membri
Direttiva 2001/18/CE	Rilascio deliberato di organismi geneticamente modificati nell'ambiente
Decreto legislativo 81/2008 Decreto legislativo 106/2009 disposizioni integrative e correttive al Decreto legislativo 81/2008	Testo Unico sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro.
Decreto legislativo 116/92 recepimento della Direttiva CEE 86/609)	Sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici

Tabella. 7 – Normativa sui medicinali sperimentali per terapia genica

Gli aspetti regolatori della terapia genica coprono diversi campi:

- ricerca sperimentale;
- studi preclinici, inclusi quelli sugli animali;
- preparazione e produzione di prodotti per terapia genica;
- sperimentazione e sviluppo clinico.

Ogni utilizzatore/produttore, al momento di iniziare una ricerca sperimentale per terapia genica che preveda l'impiego di MOGM, è tenuto a:

- inviare una notifica al Ministero della Salute, indicando tutti i dati relativi all'impianto (laboratori, stabulari) che intende utilizzare, specificando per ciascun locale il tipo di confinamento adottato;
 - inviare una notifica al Ministero della Salute per ogni impiego che implichi l'utilizzo di MOGM.
1. Come prescritto dal D. Lgs. 81/08 e dalle sue successive integrazioni, l'utilizzatore/produttore deve procedere ad una valutazione preliminare del rischio derivante dagli agenti biologici impiegati, che tenga conto del gruppo di rischio di appartenenza, integrato con una valutazione della sicurezza riguardante le procedure che sono state utilizzate per minimizzare o eliminare il rischio di contaminazione.
 2. A tal proposito occorre considerare la valutazione del rischio di impiego confinato legata allo sviluppo di costrutti per terapia genica e la loro sperimentazione clinica. La valutazione deve essere aggiornata alla luce delle nuove evidenze scientifiche, deve essere analizzata in rapporto al sistema biologico utilizzato, ai suoi vantaggi rispetto a sistemi alternativi ed in relazione ai benefici attesi.
 3. Successivamente deve essere fatta una valutazione della sperimentazione clinica, con riferimento ai rischi riguardanti il paziente che riceve il transgene, la salute pubblica e l'ambiente in generale

L'impiego di **terapia genica in animali**, nell'ambito di studi preclinici, comporta il rispetto delle norme vigenti. Aspetti importanti da considerare:

- livello di contenimento del laboratorio/stabulario nel quale vengono manipolati gli animali (gli stabulari e gli impieghi confinati di MOGM devono essere autorizzati);
- accertamento di potenziale ricombinazione *in vivo*;
- effetti farmacologici/tossicologici;
- problemi immunologici;
- aspetti etici della manipolazione animale.

Si sottolinea che, considerata la varietà degli approcci terapeutici, le metodiche ed il grado di approfondimento degli studi preclinici andranno valutati caso per caso. I livelli di contenimento ed i controlli da effettuare saranno determinati dalla natura del gene da trasdurre e dal tipo di vettore utilizzato.

Le linee guida dell'ISS sulla **sperimentazione clinica di fase I** con medicinali sperimentali per terapia genica (Linee guida sulla sperimentazione clinica di fase I con medicinali sperimentali per terapia genica somatica (ISS). Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, Volume 17, n. 7/8 Luglio/Agosto, www.iss.it/binary/publ/publi/0478.1106653420.pdf), dovranno essere seguite durante lo sviluppo del medicinale sperimentale, nella produzione dei dati scientifici e nella preparazione della documentazione da presentare all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) allo scopo di ottenere l'autorizzazione del medicinale sperimentale alla sperimentazione clinica di fase I (Rif: DPR 439/2001).

Contestualmente è necessario ottenere l'autorizzazione all'impiego confinato di MOGM per le strutture cliniche in cui sarà svolta la sperimentazione. (Vedere modulistica del Ministero della Salute).

È inoltre indispensabile tener conto delle caratteristiche dei locali in cui si svolge la sperimentazione o il soggiorno del paziente. Infatti l'impiego in clinica dei vettori al momento maggiormente usati per terapia genica potrebbe in teoria presentare dei rischi per il personale ospedaliero e per la comunità.

Le modalità di eliminazione delle particelle virali dall'organismo e le modalità di trasmissione e contagio di soggetti umani variano a seconda della specie virale interessata. Esistono virus che vengono eliminati per via respiratoria, sia liberi, sia veicolati dalle goccioline di Flugge (ad es. gli Adenovirus sono tra i virus proposti come vettori di geni terapeutici), e virus che si trasmettono per via parenterale e/o sessuale, per contatto con secrezioni varie (alcuni virus erpetici ed i retrovirus, anch'essi proposti come vettori di geni, sono meno facilmente diffusibili e richiedono contatti più stretti).

Il controllo della diffusione delle infezioni virali è particolarmente arduo, data la grande diffusibilità di alcuni di questi agenti e le loro ridottissime dimensioni. Peraltro, poiché i virus circolano di solito veicolati da particelle liquide o di polvere, anche l'uso di procedure (filtri, ecc.) non in grado di bloccare particelle delle dimensioni di un virus, ma capaci di fermare particelle di aerosol che veicolano virus, potrebbe essere utile per limitare il rischio di diffusione.

Se l'agente biologico si replica e può essere rinvenuto nel sangue e/o nei secreti, e quindi può contaminare l'ambiente, le precauzioni dovrebbero essere maggiori e diverse a seconda del tipo di contatto necessario per la trasmissione, prevedendo modalità di contenimento in grado di limitare al massimo la diffusione attraverso qualunque via (precauzioni standard, precauzioni per contatto, precauzioni per via aerea). Le direttive di isolamento dovranno comunque essere modulate sulle caratteristiche dei virus impiegati e potranno essere quindi più o meno severe a seconda delle caratteristiche di replicazione ed eliminazione dell'agente impiegato.

Occorre comunque considerare che il possibile rischio che deriva dall'impiego dei vettori virali dovrebbe in realtà essere già ridotto al minimo nel corso degli studi preclinici, che quindi rappresentano la maggiore garanzia di sicurezza dell'impiego di vettori in terapia genica. Si ritiene comunque necessario durante l'impiego clinico di questi vettori, applicare una serie di precauzioni generali e specifiche, pur sottolineando che nessuna delle procedure indicate può ridurre a zero il rischio di diffusione di un agente virale e che la sicurezza di impiego resta soprattutto affidata ad una completa conoscenza preclinica delle caratteristiche degli agenti impiegati.

Vettori per terapia genica

Il trasferimento di un transgene nella cellula bersaglio necessita di un sistema vettore in grado di veicolare all'interno il DNA.

Esistono due grandi categorie di vettori che consentono il trasferimento genico:

vettori non virali: si basano sull'uso di DNA, da solo o complessato a molecole che ne facilitino l'ingresso nella cellula.

vettori non virali

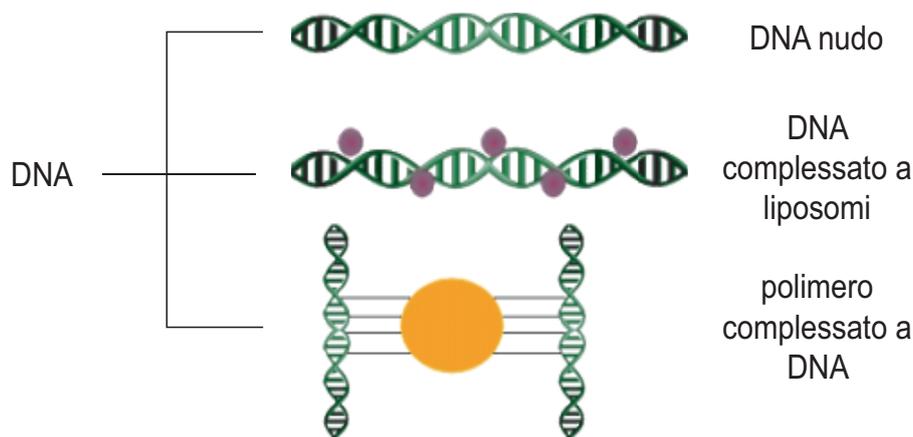


Figura. 8

vettori virali: si basano sull'utilizzo di virus opportunamente modificati in modo tale da poter veicolare il loro genoma all'interno delle cellule bersaglio, senza indurre patogenicità. I virus, sono microorganismi esistenti in natura specializzati nel trasferimento di informazione genetica nelle cellule. Per questa ragione si è pensato di sfruttare questa loro peculiarità adattandola alle opportune necessità. A differenza dei virus, infatti, i vettori da essi derivati, non sono in grado di portare a termine un'infezione produttiva poiché in seguito all'introduzione del materiale genetico (trasduzione) non avviene la replicazione e la propagazione del vettore. Tuttavia durante l'evoluzione gli organismi hanno sviluppato barriere fisiche e biologiche, quali le membrane cellulari, il complesso sistema immunitario, per evitare proprio l'introduzione di materiale genetico esogeno al loro interno da parte dei virus. Questo rappresenta un'ulteriore difficoltà da tenere in considerazione nello sviluppo e nell'applicazione dei vettori virali. I vettori virali attualmente utilizzati sono derivati da retrovirus, adenovirus, virus adenoassociati ed herpes virus, inoltre questi vengono suddivisi ulteriormente in integranti, per la loro capacità di integrare il loro genoma nel genoma della cellula ospite (retrovirus e adenoassociati), e non integranti (adenovirus e virus erpetici). Il costrutto di un vettore virale prevede la delezione parziale o totale di alcuni geni virali solitamente responsabili dell'attività patologica o di attività accessorie, quindi non indispensabili per l'inserimento del transgene nella cellula. L'eliminazione di parti del genoma virale originale consente anche di avere maggior spazio a disposizione per inserire la cosiddetta "cassetta di espressione" (contenente il transgene e possibilmente un promotore che guidi la sua espressione). Non esiste un vettore ideale adatto per ogni situazione, ma ognuno di essi è caratterizzato da vantaggi e svantaggi da prendere in considerazione di volta in volta, in relazione alle caratteristiche della patologia da trattare.

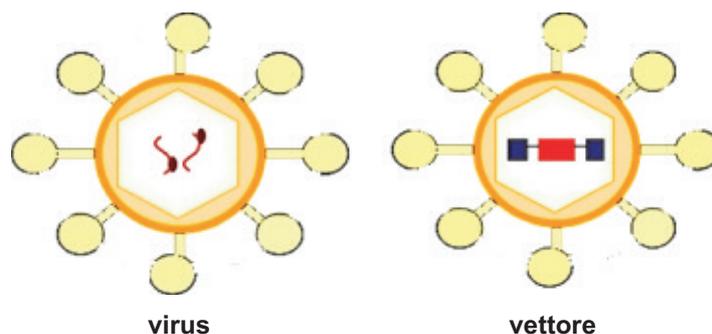
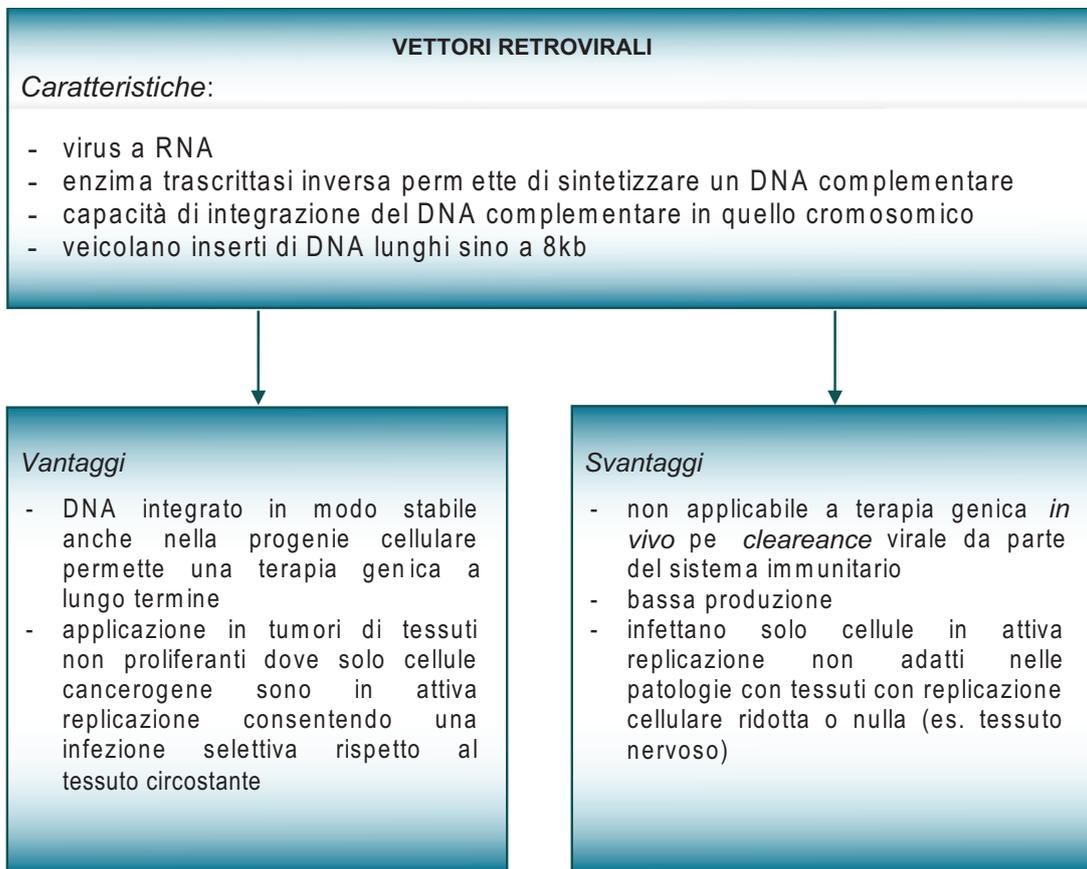


Figura. 9



I Retrovirus sono classificati in 7 subgeneri: alfa, beta, gamma, delta e epsilon- retrovirus, più i lentivirus e gli spumavirus. I Gammaretrovirus, conosciuti come oncoretrovirus, [ad es. murine leukaemia viruses (MuLV), feline leukaemia virus (FeLV), e gibbon ape leukemia virus (GALV)] sono stati per 12 anni i virus più utilizzati per lo sviluppo di vettori e per le applicazioni cliniche.

I vettori retrovirali che derivano principalmente dall'oncoretrovirus Moloney Leukemia Virus (MoLV) sono stati tra i primi ad essere sviluppati, grazie alla relativa semplicità di costruzione, alla loro capacità di trasdurre un'ampia varietà di tipi cellulari integrandosi all'interno del genoma e alla loro non patogenicità per l'uomo. Questi vettori sono in grado di accogliere fino a circa 7Kb di DNA esogeno contenente il transgene. Nonostante questi vantaggi, la divisione cellulare è un requisito indispensabile per permettere a questi vettori di trasdurre la cellula e di integrare il genoma e questo limita il loro utilizzo a bersagli cellulari che naturalmente o artificialmente siano in attiva proliferazione.

Per ovviare a questo problema, sono stati realizzati dei costrutti derivati da lentivirus, come l'Human Immunodeficiency Virus (HIV). A differenza degli oncoretrovirus, per i quali la divisione cellulare rappresenta un requisito indispensabile per l'integrazione nel genoma della cellula infettata, i lentivirus hanno la capacità di integrare il proprio genoma in quello di una cellula ospite non in proliferazione, grazie alla capacità del provirus di attraversare la membrana nucleare. Progressive modifiche nella generazioni dei costrutti virali hanno permesso di ottenere un vettore lentivirale costituito da meno del 10% del genoma virale iniziale in cui sono presenti solo le sequenze necessarie a retrotrascrivere, trasferire ed integrare la cassetta di espressione nelle cellule bersaglio e sono assenti i geni per le proteine virali patogene.

La costruzione di questi vettori ha raggiunto buoni livelli di biosicurezza, grazie anche all'inattivazione del promotore virale originale presente nelle *long terminal repeat* (LTR). I vettori lentivirali hanno dimostrato una buona efficienza di trasduzione sia *in vitro* sia *in vivo*, affiancando alle qualità dei vettori basati su oncoretrovirus la capacità di trasdurre cellule non in attiva proliferazione, come ad esempio gli epatociti, le cellule muscolari e le cellule staminali emopoietiche.

I vettori retrovirali e lentivirali possono essere modificati geneticamente in modo da esprimere sul pericapside proteine di superficie diverse da quelle presenti nei virus parentali. Questa operazione è detta *pseudotipizzazione*. Le proteine dell'*envelope*, legando differenti componenti proteiche delle cellule ospiti, determinano il tropismo del virus. Attraverso la pseudotipizzazione è possibile modificare il tropismo del vettore, ampliando o restringendo a seconda dello scopo da perseguire lo spettro d'ospite dei diversi tipi cellulari.

Uno svantaggio dei vettori derivati da virus integranti come MoLV o HIV è rappresentato dal fatto che l'integrazione nel genoma avviene in modo non controllato e questo può comportare fenomeni di mutagenesi inserzionale. È infatti possibile che il vettore si inserisca all'interno di un gene cellulare essenziale, determinandone la perdita di funzione e la morte della singola cellula, oppure che il vettore si inserisca all'interno di geni oncosoppressori, inattivandoli, o in prossimità di protooncogeni, alterandone i profili di espressione e potenzialmente attivandoli in un contesto dove dovrebbero essere silenti. In quest'ultimo caso, la cellula contenente quella specifica integrazione potrebbe acquisire un vantaggio proliferativo sulle altre dando origine a una popolazione cellulare espansa più favorevole alla trasformazione tumorale. Questa evenienza, per quanto rara, è da tenere in attenta considerazione nella scelta di un protocollo di terapia genica. I vettori lentivirali di ultima generazione, a differenza dei loro predecessori (i vettori oncoretrovirali), stanno raggiungendo solo adesso le prime fasi di sperimentazione clinica, ma rappresentano una promessa di cura per molte malattie genetiche.

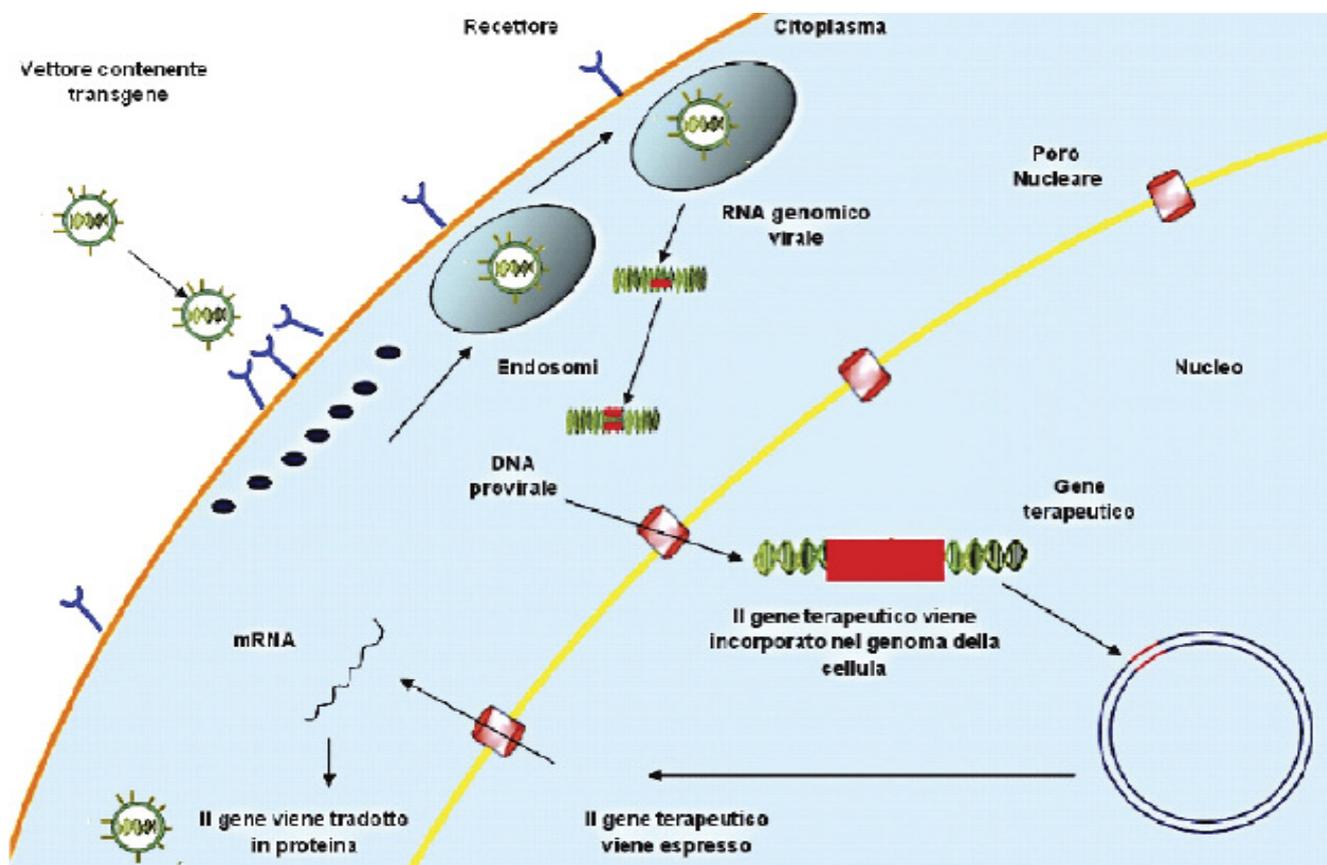
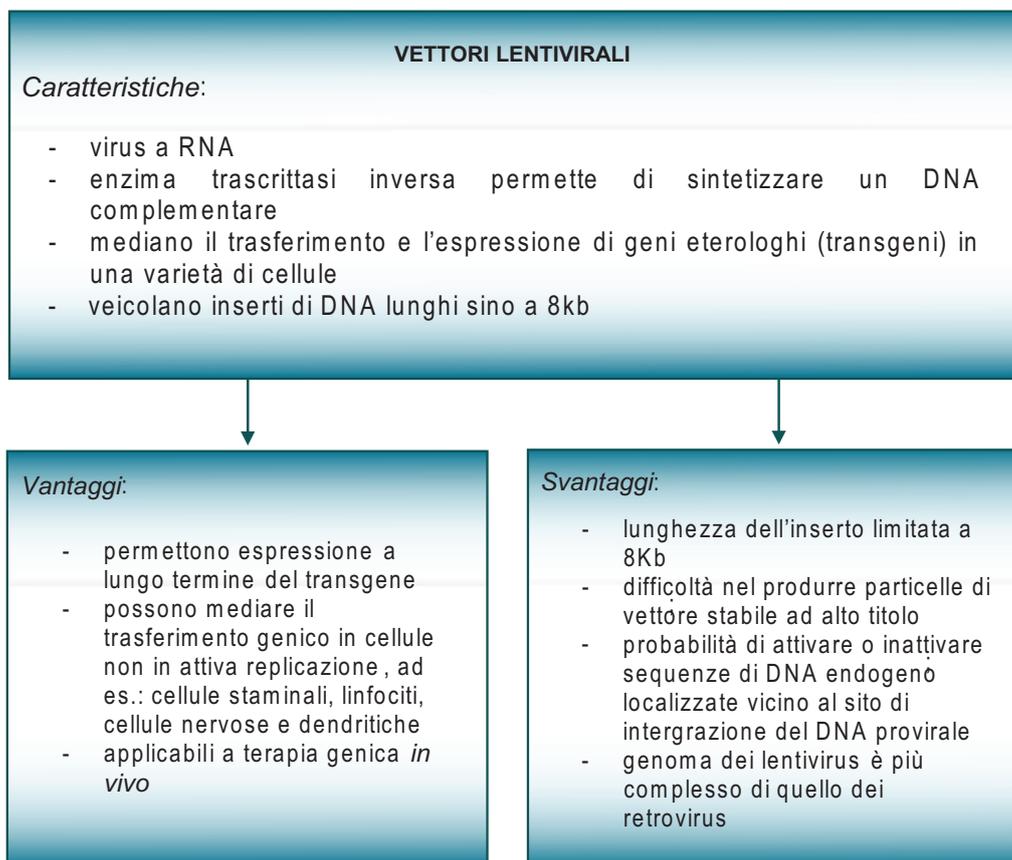


Figura. 10 - Fasi della trasduzione mediata da vettori retrovirali.

Il vettore contenente il transgene attraversa la membrana plasmatica della cellula bersaglio. Il genoma virale a RNA viene rilasciato all'interno della cellula dove viene retrotrascritto in DNA a doppio filamento dalla trascrittasi inversa. Il pro-virus entra nel nucleo, si integra nel genoma della cellula ospite, dove utilizza i meccanismi propri della cellula e il transgene integrato viene trascritto in mRNA e tradotto in proteina come un normale gene cellulare.



Principali preoccupazioni per quanto riguarda la produzione e l'uso clinico sono:

- la potenziale generazione di lentivirus competenti per la replicazione durante la produzione;
- ricombinazione *in vivo* con sequenze lentivirali;
- inserzione del DNA provirale vicino o all'interno di geni che possono innescare l'induzione di una cancerogenesi.

PROGETTAZIONE DI VETTORI LENTIVIRALI (VL)

Devono essere impiegati tutti i mezzi possibili per ridurre la patogenicità associata con l'uso di lentivirus wild-type (WT), nella produzione di VL e ridurre al minimo i rischi connessi con il loro uso.

Questo si può ottenere utilizzando:

- “genomi lentivirali minimi” attraverso l'eliminazione dei geni lentivirali per la virulenza o accessori
- separazione dei geni/sequenze lentivirali essenziali per la costruzione del VL in opportune costrutti/cassette che riducono al minimo la possibilità di generazione di Lentivirus Competenti per la Replicazione (RCL).

Attualmente la maggior parte dei processi di produzione VL impiega almeno tre plasmidi:

1. un costrutto *envelope*, vettore di pseudotipizzazione, che esprime una proteina *envelope* virale eterologa, ad esempio, la glicoproteina del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), per sostituire la proteina *envelope* omologa lentivirale;
2. un costrutto *helper*, o due costrutti di *packaging* codificanti uno le proteine virali (Gag e Pol) necessarie in trans, l'altro contenente Rev sotto il promotore del Sarcoma di Rous. Tali plasmidi sono difettivi per il segnale di packaging, per tutti i geni accessori e per il gene Tat;
3. un costrutto che ospita il transgene, comprese le sequenze necessarie per la produzione e il *packaging* del vettore di espressione VL, comunemente denominato il costrutto “*transfer*”.

Alternativamente, VL può essere realizzato utilizzando un costrutto che codifica per il *transfer vector* e una sola cassetta contenente i geni per l'*envelope* e il *packaging*, attentamente progettati per ridurre il rischio di ricombinazione. In particolare, le omologie di sequenza tra i costrutti *transfer* e *packaging* (*envelope* e *helper*) sono ridotte al minimo per prevenire eventi di ricombinazione.

Il problema della biosicurezza è fondamentale nella valutazione di impiego di MOGM e per garantirla i vettori lentivirali hanno subito nel tempo successive modifiche, sino a giungere alla costruzione dei vettori di 3° generazione. Questi ultimi sono caratterizzati dall'assenza nel genoma della maggior parte dei geni coinvolti nella patogenicità.

Per quanto riguarda il *transfer vector*, sono state effettuate modificazioni in seguito alle preoccupazioni di mobilitazione del vettore con possibile attivazione di protooncogeni nelle cellule bersaglio attraverso l'inserzione del promotore, presente nel vettore, in loro prossimità. La modificazione SIN (*Self Inactivating*) introdotta nel vettore lentivirale derivato dal virus HIV potrebbe impedire la mobilitazione del vettore e la ricombinazione con il ceppo WT. Anche le LTR del ceppo WT presenti nel vettore di trasferimento di prima generazione, sono state attualmente sostituite dal promotore di un virus non correlato Citomegalovirus (CMV) o Virus Sarcoma di Rous (RSV).

Anche se è necessario considerare che promotori forti, come il promotore di CMV, contengono sequenze *enhancer* che possono attivare proto-oncogeni.

Ulteriori modifiche per ottenere una maggiore sicurezza includono la separazione, in due costrutti di *packaging* indipendenti, dei geni *rev* e *gag/pol* e la sostituzione di segnali retrovirali di poliadenilazione. Inoltre sono stati deleti tutti i geni accessori e il gene *rev* è presente in una forma incompleta. Tuttavia, tali modifiche non devono esse stesse introdurre nuovi rischi per la sicurezza e le performance del vettore. Sono necessari esperimenti *in vitro* e/o *in vivo* per valutare le caratteristiche del costrutto tra cui il rischio di generazione di Lentivirus Competenti per la Replicazione.

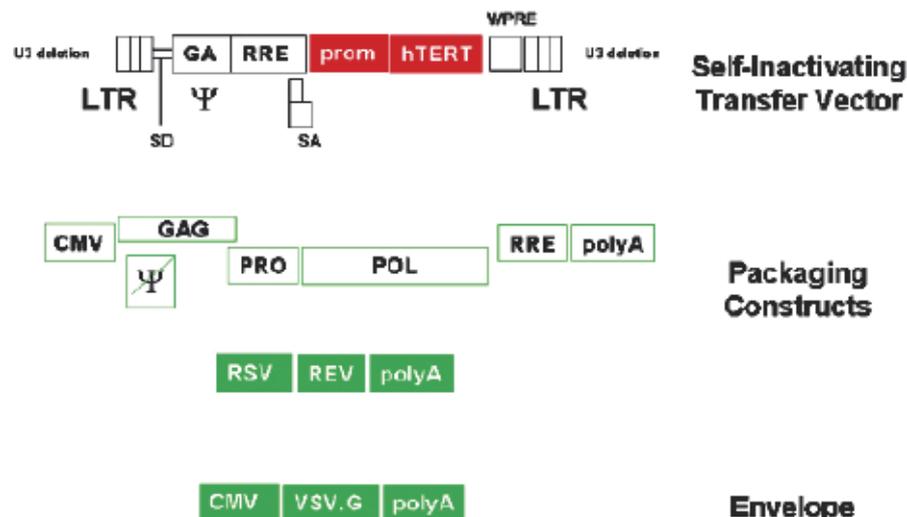


Figura. 11 - Vettore virale di terza generazione

VETTORI CON VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV)

Caratteristiche:

- virus a RNA;
- enzima trascrittasi inversa permette di sintetizzare un DNA complementare
- non c'è integrazione del DNA;
- tropismo specifico per sistema nervoso centrale possono instaurare nei neuroni infezioni latenti che durano anche tutta la vita;
- applicazione nella terapia di patologie neurologiche quali il morbo di Parkinson, di Alzheimer e di Huntington;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 20kb.



Vantaggi:

- non è possibile avere un'espressione a lungo termine dei geni inseriti per mancanza di integrazione

VETTORI ADENOVIRALI

Caratteristiche:

- virus a DNA;
- tropismo particolare per l'epitelio respiratorio, la cornea ed il tratto gastrointestinale;
- infettare un'ampia gamma di tipi cellulari;
- non c'è integrazione del DNA;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 7-8kb.



Vantaggi:

- possono essere prodotti con titoli elevati;
- applicazione nella terapia genica per patologie genetiche ereditarie.



Svantaggi:

- non è possibile avere un'espressione a lungo termine dei geni inseriti per mancanza di integrazione;
- difficile applicazione in terapia genica contro il cancro potendo infettare ogni tipo di cellula non è possibile avere una azione di tossicità selettiva solo per cellule cancerogene;
- inducono forti risposte immunitarie.

VETTORI CON VIRUS ADENOASSOCIATI (AAV)

Caratteristiche:

- virus a DNA a singolo filamento;
- di solito non in grado di effettuare infezione produttiva senza la collaborazione di un virus helper coinfezante (es. adenovirus o HSV) ;
- senza coinfezione DNA virale si integra nel DNA cromosomico in un sito specifico, solo una successiva coinfezione attiva il DNA del virus integrato;
- veicolano inserti di DNA piccoli fino a 4.5kb.



Vantaggi:

- fornisce espressione genica a lungo termine con un elevato grado di sicurezza, poiché si integrano nel cromosoma ma, poiché per inserire il gene esogeno occorre eliminare il 96% del loro genoma originario, non possiedono quasi più elementi virali.

I vettori virali non competenti per la replicazione, devono essere necessariamente prodotti attraverso l'espressione delle funzioni difettive nel vettore in adatte linee cellulari (*packaging cells*).

È necessario fornire informazioni sull'origine e le caratteristiche delle *packaging cells*, nonché la descrizione, caratterizzazione e sequenziamento (quest'ultimo solo nel caso di vettori retrovirali e lentivirali) di tutti i costrutti molecolari che forniscono le funzioni difettive al vettore virale.

Replication Competent Virus -RCV

Particolare attenzione dovrà essere rivolta a ridurre al minimo la possibilità di eventi di ricombinazione in grado di generare particelle virali competenti per la replicazione (**Replication Competent Virus -RCV**), nonché alle relative metodiche di saggio. In questa prospettiva, andranno eliminate tutte quelle sequenze virali non necessarie per la produzione/espressione del vettore virale. Andranno altresì ridotte al minimo tutte quelle sequenze che presentano omologie conosciute con virus competenti per la replicazione o con virus endogeni umani. In particolare, nel caso di vettori retrovirali, andrà eliminata ogni omologia di sequenza tra il vettore e i costrutti *packaging*, potenzialmente in grado di originare retrovirus competenti per la replicazione attraverso eventi di ricombinazione. Con lo stesso criterio, sarà anche necessario che le diverse funzioni *packaging* vengano espresse il più possibile da vettori indipendenti.

I genomi retro- e lentivirali presentano all'estremità 3' una sequenza regolatoria/promotrice (3'LTR) che, una volta inserita nel genoma delle cellule ospite, è potenzialmente in grado di promuovere l'espressione di geni cellulari adiacenti. Per escludere ragionevolmente questa possibilità, si raccomanda che i vettori retro- e lentivirali siano costruiti in modo tale che, una volta integrati, perdano qualsiasi funzione regolatoria/promotrice alla propria estremità 3'.

Possibili conseguenze indesiderate derivanti dall'uso clinico di medicinali sperimentali per terapia genica da considerare attentamente nella valutazione del protocollo clinico.

Mutagenesi inserzionale

L'integrazione di materiale genetico esogeno nel genoma di cellule bersaglio può dar luogo a una serie di fenomeni indesiderati quali:

- inattivazione di un gene soppressore di tumori;
- *cis* - o *trans*-attivazione di proto-oncogeni o altri geni capaci di promuovere proliferazione cellulare;
- variazioni nella capacità delle cellule a rispondere ad agenti quali fattori di crescita, citochine o ormoni, con conseguente acquisizione di potenziale tumorigenicità.

L'insorgenza di eventi di mutagenesi inserzionale è stata osservata di recente in uno studio di terapia genica facente uso di cellule staminali emopoietiche trasdotte *ex vivo* con vettori retrovirali.

Nei protocolli che prevedono l'utilizzazione di cellule trasdotte *ex vivo* con vettori retrovirali o lentivirali, o comunque potenzialmente capaci di generare eventi di mutagenesi inserzionale, le condizioni di trasduzione e le dosi dovranno essere giustificate in rapporto ai dati di integrazione già disponibili e i pazienti dovranno essere sottoposti a monitoraggio per verificare l'inserzione del vettore. Negli altri tipi di protocollo, la necessità di monitorare i pazienti per l'integrazione del vettore verrà valutata caso per caso. In tutti i casi, tale monitoraggio non deve essere considerato un surrogato del controllo di effetti avversi del trattamento.

Riattivazione di virus latenti

Il protocollo clinico dovrà prendere in considerazione la possibile riattivazione nel paziente di virus latenti (quali *Herpes virus*, *Epstein-Barr*, *Citomegalovirus*) e prevedere relativi adeguati controlli sia nella selezione dei pazienti che nel periodo di osservazione successivo alla terapia. Altrettanto vale per la possibilità di complementazione nel paziente di vettori virali deficienti per la replicazione a causa della presenza di virus endogeni.

Effetti immunitari

La sovra-espressione del gene terapeutico e/o di qualsiasi costituente del vettore genico, in particolare in organi o tessuti non bersaglio, può portare ad una attivazione indesiderata del sistema immune (ad esempio, risposte infiammatorie croniche, induzione di fenomeni di auto-immunità). Dovrà essere presa in considerazione l'immunogenicità del prodotto del gene introdotto, indipendentemente dal fatto che il meccanismo d'azione previsto sia mediato o meno dalla risposta immune.

Mobilizzazione del materiale genetico

Come è stato già evidenziato, la competenza alla replicazione virale recuperata *in vivo* in seguito a eventi di co- o super-infezione del paziente con virus correlati, oppure a seguito di eventi di ricombinazione con sequenze virali endogene, può portare alla mobilizzazione del materiale genetico verso cellule non-bersaglio (ad esempio, cellule della linea germinale) o alla sua diffusione verso il personale medico o para-medico, verso i familiari del paziente o ad altri. Nel protocollo clinico dovranno essere descritte le procedure atte a riconoscere e minimizzare questi rischi.

Considerazioni in termini di salute pubblica

Dovranno essere considerati:

- quali sono le possibilità che il vettore contenente il materiale genetico possa propagarsi oltre il bersaglio previsto (ad esempio, diffusione di vettori competenti per la replicazione, ricombinazione con virus *helper*, ecc.);
- le misure preventive intese a minimizzare o eliminare il rischio di diffusione del prodotto ad altri individui come il personale medico infermieristico o nell'ambiente;
- quali saggi sono previsti per controllare un'eventuale diffusione del medicinale sperimentale al di fuori del soggetto della sperimentazione;
- se e per quanto tempo il paziente dovrà essere mantenuto in isolamento e in base a quali criteri potrà uscirne;
- i criteri di selezione del personale medico e paramedico che può venire in contatto col paziente e con suo materiale biologico;
- come tale personale viene informato sul protocollo sperimentale.
- eventuali accertamenti da eseguirsi sul personale.

LA NOTIFICA DI IMPIEGO CONFINATO PER MEDICINALI SPERIMENTALI PER TERAPIA GENICA RICHIEDE LE SEGUENTI INFORMAZIONI

La notifica di impiego confinato per medicinali sperimentali per terapia genica richiede le seguenti informazioni (linee guida sulla sperimentazione clinica di fase I con medicinali sperimentali per terapia genica somatica (ISS). Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, Volume 17, n. 7/8 Luglio/Agosto. MC Galli, G Migliaccio):

- origine del vettore e descrizione dettagliata delle modifiche apportate, modalità di introduzione;
- descrizione delle modifiche del vettore che ne impediscono la replicazione e riducono la probabilità di ricombinazione con virus selvatici;
- descrizione dei metodi di amplificazione dei vettori virali e delle cellule mediante le quali tale amplificazione viene condotta. Se la propagazione virale richiede la coinfezione della linea di impaccettamento con un virus *helper* o l'introduzione di altro materiale genetico, descrizione delle modalità di rimozione di eventuali virioni, proteine virali o materiale genetico indesiderati dal prodotto finale;
- documentazione circa l'origine e le caratteristiche biologiche del virus parentale; dettagliata descrizione, caratterizzazione e identificazione delle sequenze terapeutiche inserite, siano esse codificanti o regolatorie. Tutte le sequenze virali modificate per la costruzione del vettore andranno indicate e caratterizzate almeno attraverso adeguate analisi di restrizione. Nel caso dei vettori retro- e lentivirali, nonché dei vettori adeno-associati e dei vettori *amplicon*, è richiesta la verifica sperimentale della sequenza dell'intero vettore;
- descrizione del rationale scientifico alla base della scelta del vettore virale per la patologia considerata. Nel caso in cui saranno preferiti vettori virali competenti per la replicazione, è richiesta un'approfondita giustificazione basata su consolidati dati scientifici. In particolare, andranno considerati i seguenti punti:
 - a) motivazione della necessità della competenza per la replicazione del vettore virale ai fini dell'efficacia del medicinale sperimentale;
 - b) dimostrazione dell'assenza di elementi genetici potenzialmente coinvolti in processi oncogenetici se non giustificati dall'approccio sperimentale;
 - c) se il virus parentale ha proprietà patogenetiche, indicazione del tipo di manipolazioni genetiche effettuate per eliminare l'effetto patogenetico dal prodotto finito oppure delle misure terapeutiche disponibili;
 - d) indicazione dei tessuti dove ci si aspetta la replicazione del vettore, fornendo evidenze che confermino l'ipotesi;
 - e) valutazione della sicurezza d'uso, oltre che per il paziente, anche per gli operatori sanitari e per la popolazione umana in generale.

Nel caso di vettori virali non competenti per la replicazione, questi devono necessariamente essere prodotti attraverso l'espressione delle funzioni difettive nel vettore in adatte linee cellulari (*packaging cells*). Saranno quindi richieste l'origine e le caratteristiche delle *packaging cells*, nonché la descrizione, caratterizzazione e sequenziamento (quest'ultimo solo nel caso di vettori retrovirali e lentivirali) di tutti i costrutti molecolari che forniscono le funzioni difettive al vettore virale.

Particolare attenzione dovrà essere rivolta nel ridurre al minimo la possibilità di eventi di ricombinazione in grado di generare particelle virali competenti per la replicazione (*Replication Competent Virus - RCV*), nonché alle relative metodiche di saggio. In questa prospettiva, andranno eliminate tutte quelle sequenze virali non necessarie per la produzione/espressione del vettore virale. Andranno altresì ridotte al minimo tutte quelle sequenze che presentano omologie conosciute con virus competenti per la replicazione o con virus endogeni umani. In particolare, nel caso di vettori retrovirali, andrà eliminata ogni omologia di sequenza tra il vettore e i costrutti *packaging*, potenzialmente in grado di originare retrovirus competenti per la replicazione attraverso eventi di ricombinazione. Con lo stesso criterio, sarà anche necessario che le diverse funzioni *packaging* vengano espresse il più possibile da vettori indipendenti. I genomi retro- e lentivirali presentano all'estremità 3' una sequenza regolatoria/promotrice (3'LTR) che, una volta inserita nel genoma delle cellule ospite, è potenzialmente in grado di promuovere l'espressione di geni cellulari adiacenti. Per escludere ragionevolmente questa possibilità, si raccomanda che i vettori retro- e lentivirali siano costruiti in modo tale che, una volta integrati, perdano qualsiasi funzione regolatoria/promotrice alla propria estremità 3'.

Inoltre nell'ambito della valutazione del rischio per la produzione di **vettori lentivirali** devono essere considerate tutte le possibili combinazioni dei plasmidi utilizzati (Tabella. 8):

<i>Packaging vector</i>	<i>Envelope vector</i>	<i>Transfer vector</i>
I-II- generazione	Non in grado di trasdurre cellule umane	Specificare promotore, geni e se si tratta di un costrutto SIN (self-inactivating)
III generazione con integrasi difettiva per l'integrazione	In grado di trasdurre cellule umane	Contenente geni non patogenetici (geni marcatori, geni terapeutici, geni regolatori)
III generazione con integrasi competente per l'integrazione		Contenente geni con potenziale patogenetico (oncogeni o geni tossici)

Tabella. 8

Fare un elenco dei MOGM risultanti (Tabella. 9):

Elenco dei MOGM risultanti dalla combinazione dei vettori <i>transfer</i>, <i>envelope</i> e <i>packaging</i>
Specificare se la trasfezione è transiente o stabile.
Effettuare un valutazione del rischio in relazione ai singoli vettori che saranno utilizzati.
Valutare i diversi profili di biosicurezza in seguito all'impiego delle diverse combinazioni di vettori che si intendono utilizzare all'interno dello stesso disegno sperimentale.

Tabella. 9

Riempire la Tabella 10

A partire dal 1 Gennaio 2010, i moduli di notifica di impiego MOGM saranno modificati, verrà introdotta la tabella al punto X del modulo di notifica di impiego di classe 2 e al punto XI del modulo di notifica di impiego delle classi 3 e 4, che dovrà essere compilata dal notificante (responsabile scientifico e gestionale dell'impiego confinato) in modo che risultino i MOGM che intende utilizzare con riferimento al progetto scientifico di cui fanno parte.

NOME DEL MOGM E PROGETTO	VETTORE	INSERTO	RICEVENTE	CLASSE DI RISCHIO
1.				
2.				
3.				
4.				

Tabella. 10 - Tabella sinottica di riepilogo del/dei MOGM che si intendono utilizzare

CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA PER GLI OPERATORI SANITARI, PER LA POPOLAZIONE UMANA IN GENERALE E PER L'AMBIENTE, PER QUEST'ULTIMO IN RELAZIONE ALLA PROBABILITÀ DI RILASCIO DI MICRORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (MOGM) E AL LORO POTENZIALE IMPATTO [Il rilascio deliberato nell'ambiente di **Organismi Geneticamente Modificati (OGM)** a scopi sperimentali e l'immissione in commercio è regolamentato dalla Direttiva 2001/18 /CE].

Nella Tabella. 11 viene riportato il metodo per la **valutazione del rischio ambientale** proposto dall'EMA "Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products":

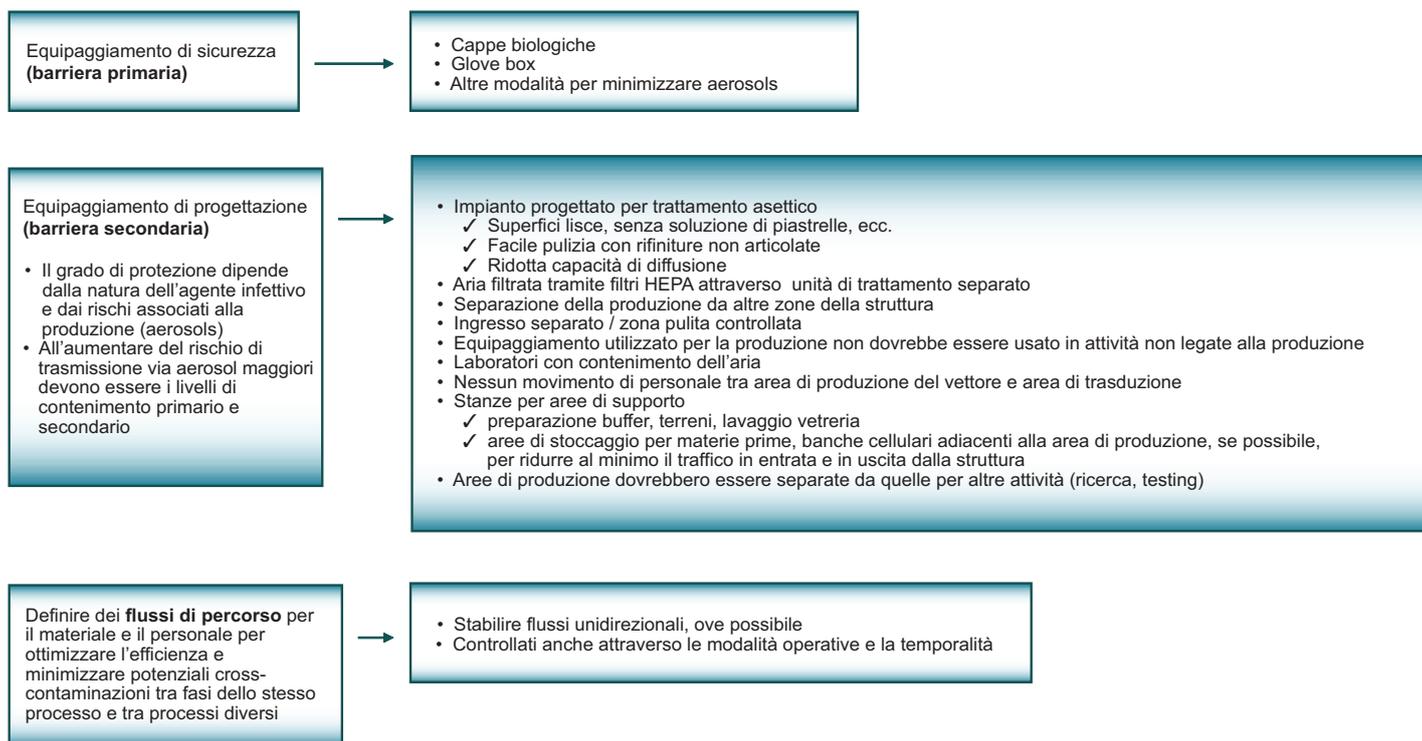
Fasi	
<p>1</p> <p>Identificazione delle caratteristiche che possono causare effetti negativi</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Biologia dell'OGM connessa con la modificazione genetica • Natura del materiale genetico inserito che può provocare effetti negativi sulla salute umana o sull'ambiente. <p>Confronto tra le caratteristiche dell'OGM con quelle del non modificato, nelle medesime condizioni di rilascio o di utilizzo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adozione del principio di precauzione • Effetti (diretti, indiretti) • Pericoli connessi con: <ul style="list-style-type: none"> ✓ microrganismo donatore e ricevente wild type (natura del patogeno, stabilità del wild type, tropismo) ✓ derivanti dal gene o dall'elemento inserito ✓ derivanti da OGM finale: alterazione caratteristiche patogene esistenti (modifica della patogenicità, suscettibilità al sistema immunitario, tropismo finale OGM vs microrganismo parentale, suscettibilità a profilassi e terapia, stabilità) ✓ trasferimento di sequenze geniche di OGM e rilascio nell'ambiente • Strategie per sicurezza vettori retrovirali (patogenicità) • Sito di inserimento del transgene • ricombinazione tra virus correlati
<p>2</p> <p>Valutazione delle potenziali conseguenze di ogni effetto negativo</p>	<p>La gravità delle conseguenze di ogni effetto negativo individuato deve essere qualificata. Conseguenze influenzate da:</p> <ul style="list-style-type: none"> • costituzione genetica dell'OGM • esposizione ambientale • stato di salute di individui potenzialmente esposti • metodo di somministrazione e frequenza d'uso dell'OGM <p>Alcune considerazioni da fare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • la diffusione di OGM nell'ambiente o le sue specie ospite • interazioni con altri organismi • effetti sulla dinamica della popolazione o la diversità genetica nell'ambiente ricevente
<p>3</p> <p>Valutazione del rischio del verificarsi di ogni potenziale effetto negativo individuato</p>	<p>Fattori coinvolti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • giudizio globale sulla idoneità di un OGM <ul style="list-style-type: none"> ✓ strategie di produzione ✓ valutazione capacità dell'OGM di stabilire infezione in vivo • probabilità che eventi rari possono verificarsi <ul style="list-style-type: none"> ✓ modalità di somministrazione al paziente (dose, via di somministrazione) ✓ modalità di possibile esposizione ambientale (grandezza, durata)
<p>4</p> <p>Stima del rischio collegato a ciascuna caratteristica identificata dell'OGM</p>	<p>La stima del rischio ambientale, l'entità delle conseguenze dei potenziali effetti avversi identificati è combinato con l'esito della valutazione del rischio.</p> <p>Il rischio può anche essere descritto in termini qualitativi. Pur non essendo possibile moltiplicare termini qualitativi, una matrice di rischio è utile come strumento per illustrare il processo di stima del rischio stesso</p>

<p>5</p> <p>Applicazione di strategie di gestione per rischi derivanti da rilascio deliberato o di commercializzazione di OGM</p>	<p>Strategie di gestione del rischio possono riguardare:</p> <ul style="list-style-type: none"> • caratterizzazione del rischio e misure di gestione • conseguenze dell'avvenuto pericolo • stima rischio
<p>6</p> <p>Determinazione del rischio generale dell'OGM</p>	<p>Sulla base dei passaggi precedenti una conclusione dovrebbe essere data se l'impatto ambientale globale è accettabile o meno. Questa valutazione finale dovrebbe essere espressa come una sintesi di tutti i rischi che sono connessi alla specifica applicazione di terapia genica</p>

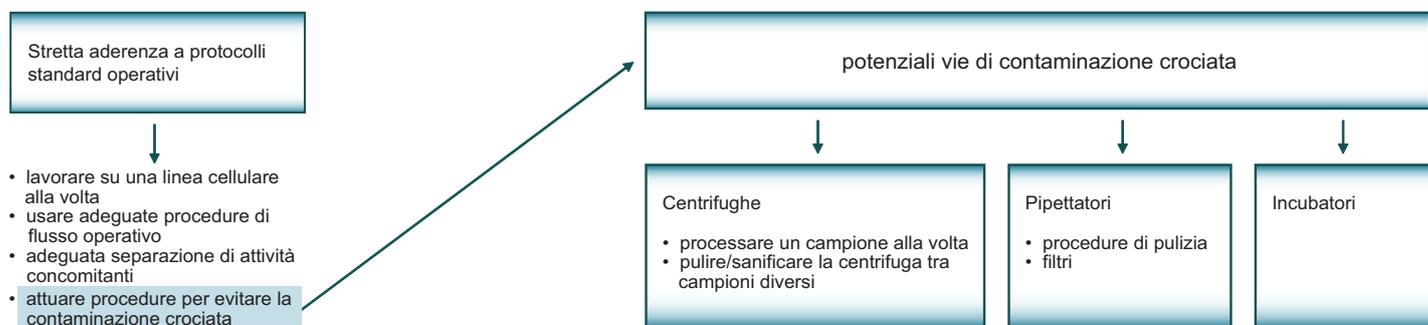
Tabella. 11

MISURE DI CONTENIMENTO DA APPLICARE PER LA GESTIONE DEL RISCHIO

- Buona prassi operativa e appropriato equipaggiamento per minimizzare l'esposizione ad agenti infettivi
- Stretta aderenza a protocolli standard operativi



- Monitoraggio ambientale e test sul prodotto devono essere previsti per assicurare un adeguato controllo nell'area di processo e per una valutazione del rischio ambientale.



Procedure di emergenza per sistemi di critici (UPS) (Tabella. 12)

Piano di emergenza	Disposizioni per i casi di emergenza derivanti dal: <ul style="list-style-type: none"> • trasporto al centro di trattamento • trasporto al sito di trattamento all'interno di centro • manipolazione di OGM contenenti il prodotto nel centro di trattamento • accidentale contatto con la pelle, con gli occhi e punture accidentali • metodi di prevenzione per l'infezione, il trattamento e metodi di prevenzione per le malattie / disponibilità di vaccini
SOP e piano di emergenza	Diversi gli aspetti riguardanti l'uso di un OGM può richiedere SOP o un piano di emergenza, e.g. smaltimento dei rifiuti, o incidenti da punture accidentali. La valutazione del rischio ambientale deve indicare se misure speciali, al di fuori di procedure standard cliniche, devono essere prese affinché i rischi ambientali siano tollerabili
Trattamento dei rifiuti	Può essere necessario utilizzare disinfettanti e successivo trattamento dei rifiuti. Le questioni ambientali che derivano valutazione di rischio ambientale. Dovrebbe anche essere considerata: la disinfezione dei materiali utilizzati per il trasporto, la preparazione o la somministrazione, comprese superfici, strumenti, cappe, abbigliamento, e guanti; l'efficacia dei metodi di disinfezione proposta; le misure adottate a seguito di un rilascio
Monitoraggio post-commercializzazione	Di seguito devono essere considerati anche: <ul style="list-style-type: none"> • effetti attesi su altri individui; su animali e / o delle piante, in materia di ambiente; • un piano di monitoraggio o motivazioni per non realizzarlo; • istituzione di metodi di monitoraggio per prevenire la diffusione al personale medico o persone per l'ambiente

Tabella. 12

DETERMINAZIONE DEL RISCHIO GENERALE DELL'OGM

Una valutazione del rischio generale dell'OGM deve essere effettuata tenendo conto delle strategie di gestione dei rischi che vengono proposte. Sulla base delle fasi individuate in precedenza dovrebbe essere valutato se l'impatto ambientale è accettabile o meno. Questa valutazione finale dovrebbe essere espressa come una sintesi di tutti i rischi che sono connessi alla specifica applicazione del protocollo di terapia genica.

Requisiti minimi di contenimento dei laboratori per impiego confinato di MOGM

LIVELLI DI CONTENIMENTO SECONDO LA DIRETTIVA 2009/41/CE

Livello 1 – laboratorio di base, indicato quando si compiono 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. In genere destinato ad insegnamento di base o di ricerca. Nel laboratorio devono essere applicate le misure minime di contenimento e di protezione. La stanza dove si svolgono le operazioni deve essere separata dall'esterno tramite una porta che deve rimanere chiusa durante le attività di lavoro. In genere non è necessaria la presenza di particolari attrezzature.

Livello 2 – laboratorio di base indicato quando si compiono operazioni a basso rischio, ovvero operazioni per le quali un livello 2 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente. In genere destinato a diagnostica di base o ricerca. Nel laboratorio devono essere applicate le misure minime di contenimento e di protezione, deve essere esposto un segnale di rischio biologico sulla porta del laboratorio e gli operatori devono essere forniti di dispositivi di protezione individuale. Prevede la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe I o II per proteggere il lavoratore da eventuale formazione di aerosol. Deve essere presente un'autoclave nell'edificio al fine di poter inattivare i rifiuti prima dello smaltimento.

Livello 3 – laboratorio di contenimento indicato quando si compiono 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. Destinato a diagnostica specialistica o ricerca. Devono essere applicate le misure di contenimento e di protezione previste dall'Allegato IV del D. Lgs 206/01, gli operatori devono essere forniti di dispositivi di protezione individuale, l'accesso deve essere controllato, il laboratorio deve essere in depressione. È necessaria la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe II il cui utilizzo è necessario in tutte le operazioni effettuate.

Livello 4 – laboratorio di contenimento indicato quando si compiono operazioni che presentano un rischio alto, ovvero operazioni per le quali un livello 4 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente. Destinato a diagnostica specialistica o ricerca con materiali infetti e/o microrganismi con un rischio potenziale o accertato elevato per l'operatore e la comunità. Devono essere applicate le misure di contenimento e di protezione previste dall'Allegato IV del D. Lgs 206/01, gli operatori devono essere forniti di dispositivi di protezione individuale, l'accesso deve essere controllato, il laboratorio deve essere in depressione. È necessaria la presenza di una cappa di sicurezza biologica di classe III il cui utilizzo è necessario in tutte le operazioni effettuate. La progettazione e l'operatività di una simile struttura prevede delle conoscenze ed esperienze gestionali comprovate.

PROGETTAZIONE DEGLI IMPIANTI: CARATTERISTICHE GENERALI

Struttura:

Le pareti, i soffitti e i pavimenti devono essere lisci, facili da pulire, impermeabili ai liquidi e resistenti agli agenti chimici e ai disinfettanti normalmente usati in laboratorio (pareti rivestite con materiale vinilico termosaldato o vernice epossidica sino ad un'altezza di m 2.00, pavimento rivestito con materiale vinilico termosaldato con una sguscia di raccordo tra la pavimentazione stessa e la parete). I materiali per i pavimenti devono essere opportunamente scelti tali da essere lisci ed antiscivolo. Le porte devono avere superfici facilmente lavabili, essere dotate di sistema di autochiusura e di finestra di osservazione, con una larghezza utile minima di m 0,80. Inoltre devono avere caratteristiche antincendio (grado predeterminato di resistenza al fuoco: REI), una larghezza utile minima di m 1,20 ed essere apribili nel senso dell'esodo.

Le finestre devono essere apribili (in assenza di aerazione meccanica) per consentire una corretta ventilazione naturale del locale e devono essere dotate di reti per la protezione da insetti ed artropodi (solo per impianti di contenimento 1 e 2). I serramenti delle finestre devono essere rivestiti in materiale impermeabile e facilmente lavabile.

Gli arredi e le superfici di lavoro devono essere robusti, saldamente ancorati, e essere uniti ai muri da sigillanti. Devono essere facilmente pulibili, impermeabili all'acqua e resistenti a disinfettanti, acidi alcali, solventi organici e al calore moderato.

Impiantistica idraulica:

Deve essere garantita una fornitura di acqua di buona qualità. Non devono esistere interconnessioni tra forniture di acqua per il laboratorio e quelle di acqua potabile; è opportuno montare un dispositivo anti riflusso a protezione del sistema idrico pubblico.

Nei locali del laboratorio le condutture esterne andrebbero evitate, nel caso in cui non fosse possibile, le tubazioni e i condotti a vista dovrebbero essere separati dal muro o dal soffitto in modo da evitare interstizi difficili da pulire; i lavabi dovrebbero essere situati in prossimità della porta di accesso e dotati di acqua corrente. Gli effluenti dei lavandini provenienti dagli impianti di livello 3 è preferibile che non siano convogliati direttamente in fognatura, ma siano sottoposti a pretrattamento (inattivazione). Anche gli effluenti della doccia di sicurezza è preferibile che siano convogliati in pilette di raccolta ed attraverso un apposito tubo in polietilene fatti confluire nella vasca di raccolta. L'acqua di raccolta non deve essere mai smaltita nella fognatura.

Impiantistica elettrica:

L'illuminazione deve essere di adeguata intensità per permettere il facile riconoscimento degli oggetti, favorire lo svolgimento delle attività dell'operatore in modo da evitarne l'affaticamento visivo ed infine rendere chiaramente percepibili eventuali situazioni pericolose. L'illuminazione naturale, ove possibile, deve essere preferita rispetto a quella artificiale al fine di favorire il benessere psico-fisico degli operatori e ridurre il consumo energetico. Le finestre devono essere dotate di sistemi che permettano la modulazione dell'intensità della luce. L'impianto di illuminazione artificiale, nel rispetto delle esigenze di risparmio energetico, deve assicurare parametri illuminotecnici quali:

1. livello e uniformità di illuminamento,
2. ripartizione delle luminanze,
3. limitazione dell'abbagliamento,
4. colore della luce e buona resa del colore,
5. illuminamento di esercizio medio, sui piani di lavoro, non inferiore a 300 lux.

Deve essere predisposto un impianto elettrico a norma, che sia adeguato alle potenze delle apparecchiature e attrezzature in uso e con un numero di prese proporzionato alle esigenze. L'impianto deve rispondere a delle caratteristiche di sicurezza, in relazione alle tipologie di sostanze utilizzate, alle apparecchiature presenti ed alle procedure operative realizzate. È necessaria la predisposizione di un impianto di illuminazione di emergenza che entri in funzione quando se ne verifichi la necessità al fine di assicurare l'evacuazione in sicurezza degli operatori.

Dove risulti necessario, in presenza di attrezzature come incubatori, cappa di sicurezza biologica e congelatori, deve essere assicurata, in caso di black-out dell'impianto principale, la fornitura continua di energia elettrica mediante un gruppo elettrogeno.

Impiantistica gas:

Deve esistere una fornitura di gas affidabile ed adeguata.; è obbligatorio avere una buona installazione e una manutenzione continua. Inoltre devono essere presenti sistemi meccanici di ventilazione che forniscano un flusso d'aria verso l'interno senza ricircolo.

In caso di utilizzo di gas tecnici (O₂, CO₂, N₂, H₂, acetilene), per evitare, all'interno dei laboratori, la presenza di bombole di gas compresso, deve essere predisposto un impianto centralizzato di distribuzione da deposito esterno, con sistema di sicurezza dotato di elettrovalvole per il blocco dell'erogazione in caso di emergenza. Inoltre, devono essere installati i relativi rivelatori di fuga di gas e di presenza di ossigeno alla concentrazione idonea, collegati al suddetto sistema di sicurezza nel caso sia presente, ed all'impianto di allarme.

Sistema antincendio:

Deve essere installato un impianto automatico di rivelazione di incendio e fumo con relativo sistema di allarme, ed eventuale sistema di spegnimento dell'incendio.

Planimetria:

I laboratori devono avere spazio sufficiente al fine di garantire gli spostamenti e le attività in sicurezza durante le operazioni di lavoro, pulizia e manutenzione evitando possibili urti accidentali contro le apparecchiature o tra gli operatori.

Deve essere previsto lo spazio sufficiente per conservare in ordine i materiali in uso e per evitarne l'accumulo sui banconi e nei corridoi, deve essere previsto uno spazio opportunamente posto al di fuori delle aree di lavoro del laboratorio, per l'immagazzinamento dei materiali. Inoltre devono essere previsti spazi e mezzi adeguati per l'impiego in sicurezza e la conservazione di solventi, materiali radioattivi, gas compressi e liquefatti. Per quantitativi limitati di sostanze pericolose, comprese quelle infiammabili, è sufficiente l'installazione di armadi ventilati di sicurezza con elevate caratteristiche antincendio (caratteristiche di sicurezza passiva: resistenza al fuoco fino a REI 180; di sicurezza attiva: ante dotate di sistema di chiusura a battente con ritorno automatico, elettroaspiratore con motore esterno termoprotetto, canale di espulsione con serranda tagliafuoco) le quali assicurino che il flusso d'aria in espulsione (aspirazione forzata) sia convogliato verso l'esterno. Per quantitativi superiori a 20 litri di infiammabili, lo stoccaggio deve essere realizzato in un deposito, esterno o interno al volume dell'edificio, avente specifiche caratteristiche di sicurezza.

Le superfici dei piani di lavoro devono essere impermeabili, resistenti ai disinfettanti, acidi, alcali, solventi organici e a calore moderato. Inoltre, se addossati ad un muro, devono essere continui con lo stesso mediante stesura, nel punto di contatto, di materiale sigillante.

Nell'area dei laboratori devono essere disponibili docce di emergenza e doccette lavaocchi di emergenza. Ogni laboratorio deve essere fornito di un lavandino, con comando di erogazione dell'acqua a pedale o a gomito, preferibilmente posizionato in prossimità dell'uscita.

Gli spogliatoi e gli spazi ricreativi devono essere situati in zone al di fuori delle aree di lavoro del laboratorio.

Nei pressi dei laboratori devono essere disponibili locali guardaroba, attrezzati con armadietti a doppio scomparto, dove gli operatori possano riporre gli indumenti personali separati da quelli di lavoro.

Negli impianti di classe 3 e 4 la zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio e separata da aree aperte al flusso di passaggio di personale. Tali laboratori devono essere sigillabili in modo da consentire la fumigazione. L'accesso al laboratorio deve avvenire attraverso una "camera di compensazione" ovvero un locale separato dal la-

boratorio. Il lato esente da contaminazioni della camera di compensazione deve essere separato dalla parte ad accesso limitato da uno spogliatoio o da impianti doccia e, preferibilmente, da porte autobloccanti a tenuta d'aria (necessarie nei laboratori di biosicurezza 4).

All'interno del locale spogliatoio è prevista un'area libera disponibile eventualmente per la futura installazione di lavello/doccia/autoclave o scaffalatura per immagazzinamento di sostanze in ambiente sicuro. Le condotte dell'aerazione devono permettere la disinfezione tramite gas.

Le finestre devono essere chiuse e sigillate per mantenere il gradiente di pressione negativa all'interno del laboratorio.

Impianto di condizionamento e ventilazione:

L'impianto di condizionamento dell'aria e le condizioni di depressione nelle aree di lavoro sono parametri estremamente critici nella strutturazione di un laboratorio di livello di contenimento 3 e 4. Secondo il D. Lgs 206/01 l'area di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella delle aree nelle immediate vicinanze.

Il sistema aeraulico deve essere in grado di garantire il filtraggio assoluto dell'aria attraverso filtri HEPA sul canale di ripresa a monte di tutti i canali di recupero dell'aria e sul sistema di immissione dell'aria nel laboratorio.

L'impianto di ventilazione prevede che l'aria immessa all'interno del laboratorio e quella emessa sia senza ricircoli per garantire l'assenza di by-pass di aria contaminata in altre zone dell'edificio. Ciò viene realizzato con un sistema di presa dell'aria esterna all'edificio che viene immessa nel laboratorio fornendo un flusso laminare costante di aria sterile in classe 100. La sterilità prima dell'immissione viene garantita da un processo di filtrazione con filtri HEPA, con efficienza superiore al 99,997% posizionati nella controsoffittatura.

L'aria filtrata dopo aver "lavato" il locale, viene ripresa dalla sezione di ventilazione attraverso apposite griglie poste alla base delle pareti perimetrali, convogliata in un sistema di filtrazione prima di essere emessa al di fuori dell'edificio.

L'aria ripresa viene a sua volta filtrata in un contenitore *canister* che consente la sostituzione dell'elemento filtrante mediante barriera di protezione con sacco di polietilene (*bag-in/bag-out*). Questo tipo di soluzione evita una possibile contaminazione del canale d'espulsione e dell'espulsore stesso, salvaguardando sia i tecnici addetti alla manutenzione dell'impianto che l'ambiente. Anche le griglie a parete sono corredate di sezione filtrante HEPA, con dispositivo *canister* per lo smontaggio, il trasporto e lo smaltimento in condizioni di sicurezza per gli operatori.

Un sistema di allarme acustico, in caso di malfunzionamento dell'espulsore entrerà in funzione permettendo al personale di lasciare immediatamente il laboratorio attraverso l'uscita di sicurezza (porta normalmente chiusa, con maniglione antipanico).

Il sistema di ventilazione compensa automaticamente l'espulsione dell'aria dalla cappa di sicurezza biologica presente all'interno del laboratorio. L'aria proveniente dalle cappe di sicurezza biologica dopo essere passata attraverso i filtri HEPA deve essere scaricata all'esterno in modo tale da evitare l'interferenza con l'equilibrio dell'aria circolante nella cappa o con il sistema di ventilazione dell'edificio.

La quantità di aria espulsa dall'impianto viene compensata dall'aspirazione di un'eguale quantità di aria fresca, filtrata, opportunamente condizionata.

È necessario che l'area di lavoro con il maggiore rischio di contaminazione ambientale sia mantenuta in una condizione di depressione in modo da assicurare che nessun agente biologico potenzialmente pericoloso possa fuoriuscire.

Il gradiente di pressione viene ottenuto mantenendo la pressione all'interno del laboratorio ad un valore inferiore (ad es.: ~ -25 Pa) della pressione della camera di compensazione (ad es.: ~ -10 Pa). Secondo il gradiente di pressione creato si verifica uno spostamento del flusso d'aria dalla zona a più alta pressione verso quella a più bassa. Ciò consente al flusso d'aria di avere un andamento unidirezionale verso l'interno del laboratorio, evitando l'uscita di aria proveniente dalle aree sottoposte a rischio biologico verso le aree circostanti.

L'impianto di ventilazione inoltre è in grado di garantire le condizioni idonee termo-igrometriche (temperatura e umidità relativa) in estate ed inverno.

Il trattamento dell'aria immessa avviene nel gruppo condizionatore ed è effettuato in modo tale che essa sia caratterizzata, all'uscita dell'unità, da temperatura ed umidità costanti. Il gruppo deve comprendere i dispositivi di prefiltrazione, di pretrattamento termico (preriscaldamento d'inverno e preraffreddamento d'estate), umidificazione a vapore, filtrazione finale costituita da sezione di celle HEPA.

All'uscita del gruppo di trattamento le condizioni termo-igrometriche dell'aria devono essere fissate ad un valore tale da assicurare, in tutti i locali, il controllo dei parametri termo-igrometrici.

La ripresa dell'aria dagli ambienti, ed il suo trasferimento all'esterno, deve essere assicurata da un'unità ventilante equipaggiata con il sistema di recupero dell'energia termica (riscaldante durante la stagione fredda; raffreddante durante quella calda). Il rispetto delle condizioni sopraindicate porta a dimensionare l'impianto con una notevole portata d'aria, deve quindi essere assicurato un numero di "ricambi d'aria/ora" maggiore di sei. In alcuni casi si può arrivare fino a 20 ricambi/ora. Ulteriore parametro di benessere è costituito dalla differenza di temperatura in uscita dai diffusori e l'aria dell'ambiente stesso. Minore è tale differenza e maggiore è il grado di benessere. In ultimo la velocità dell'aria in uscita dai diffusori non deve essere troppo elevata.

Filtri:

Tutti gli alloggiamenti dei filtri HEPA devono essere progettati per consentire la decontaminazione *in situ* del filtro prima della rimozione; in alternativa il filtro può essere rimosso in un contenitore primario sigillato, impermeabile ai gas, per la successiva decontaminazione/distruzione tramite incenerimento. Per quanto riguarda i laboratori di classe 4, secondo il D. Lgs 206/01 sia l'aria immessa nella zona di lavoro che l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile. I filtri per le particelle sospese sono progettati per prevenire la contaminazione dei prodotti o dell'ambiente

e per proteggere gli operatori da eventuali contaminazioni. Esistono 3 tipi principali, molto efficaci nella separazione di particelle di dimensioni fino a 10µm, consistono di fibre submicroniche di borosilicato, idrofobici, infiammabili e sono comunemente noti come HOSCH, HEPA, ULPA.

Le particelle o la velocità dell'aria determinano il grado di separazione, in quanto la separazione è funzione del diametro delle particelle, delle fibre e del valore di flusso attraverso le fibre.

Tipo	Separazione	Dimensione particelle	Velocità
HOSCH	da 99,97 a 99,995%	0,3 µm	0,4 m/s
HEPA	da 99,97 a 99,995%	0,3 µm	0,4 m/s
ULPA	da 99,997 a 99,999%	0,3 µm	0,4 m/s

	Livello 1	Livello 2	Livello 3	Livello 4
Ambiente di lavoro: isolamento	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
Laboratorio sigillabile per la fumigazione	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
Caratteristiche generali				
Superfici resistenti ad acqua, acidi, alcali, solventi, disinfettanti, agenti decontaminanti e facili da pulire e disinfettare	Non necessario (bancone)	Non necessario (bancone)	Necessario (bancone, arredo, pavimento)	Necessario (bancone, arredo, pavimento)
Laboratorio equipaggiato con gruppo elettrogeno	Non necessario	Non necessario	Preferibile	Necessario

Ventilazione

- flusso d'aria verso l'interno	Non necessario	Preferibile	Necessario	Necessario
- legata al sistema di ventilazione dell'edificio	Non necessario	Preferibile	Se necessario	No
- dotata di sistema indipendente	Non necessario	Preferibile	Necessario	Necessario
- Aria emessa dal laboratorio sottoposta ad ultrafiltrazione (HEPA)	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
Entrata con doppia porta	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
Pressione negativa rispetto alla pressione nelle immediate vicinanze	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
La pressione del laboratorio monitorata con un sistema di allarme nel caso di variazioni di pressione non accettabile	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
Accesso al laboratorio attraverso camera di compensazione	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Se necessario
Inattivazione dei MOGM negli effluenti dei lavandini, degli scarichi o delle docce, se presenti, o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Se necessario

Autoclave

Sul piano	Necessario	Necessario	Necessario	Necessario
Nel laboratorio	Non necessario	Non necessario	Preferibile	Necessario
A doppia entrata	Non necessario	Non necessario	Preferibile	Necessario

Cappa biologica

Classe II	Non necessario	Se necessario	Necessario	Necessario
Classe III	Non necessario	Non necessario	Preferibile	Necessario

Tabella. 13 - Riassunto dei requisiti minimi di contenimento per la progettazione di laboratori per impiego confinato di MOGM

Nella Tabella. 14 sono riportati i documenti prodotti dall'Unione Europea e dagli USA inerenti i requisiti minimi di contenimento per manipolazione di microrganismi e MOGM ai fini della tutela della salute dell'uomo e dell'ambiente.

Norme UNI	
UNI EN 12128	Biotecnologie - Laboratori di ricerca, sviluppo e analisi - Livelli di contenimento di laboratori microbiologici, aree a rischio, situazioni e requisiti fisici di sicurezza
UNI EN 12469	Biotecnologie - Criteri di prestazione per le postazioni di sicurezza microbiologica
UNI EN 13091	Biotecnologie - Criteri di prestazione per gli elementi filtranti e per i filtri
UNI EN 13095	Biotecnologie - Criteri di prestazione per i sistemi di trattamento degli effluenti gassosi
UNI EN 13312-1	Biotecnologie - Criteri di prestazione per tubazioni e strumentazione - Criteri generali di prestazione.
UNI EN 13312-2	Biotecnologie - Criteri di prestazione per tubazioni e strumentazione - Giunti
UNI EN 13312-4	Biotecnologie - Criteri di prestazione per tubazioni e strumentazione - Tubi e tubazioni.
UNI EN 13312-5	Biotecnologie - Criteri di prestazione per tubazioni e strumentazione - Valvole
UNI EN 1620	EN Large-scale process and production in biotechnology - Design of plant buildings according to the degree of hazard (1996)
Stati Uniti	<p>NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (2002) APPENDIX G. PHYSICAL CONTAINMENT Appendix G specifies physical containment for standard laboratory experiments and defines Biosafety Level 1 through Biosafety Level 4. - For large-scale (over 10 liters) research or production, Appendix K (<i>Physical Containment for Large Scale Uses of Organisms Containing Recombinant DNA Molecules</i>) supersedes Appendix G. Appendix K defines Good Large Scale Practice through Biosafety Level 3 - <u>Large Scale</u>. - For certain work with plants, Appendix P (<i>Physical and Biological Containment for Recombinant DNA Research Involving Plants</i>) supersedes Appendix G. Appendix P defines Biosafety Levels 1 through 4 - <u>Plants</u>. - For certain work with animals, Appendix Q (<i>Physical and Biological Containment for Recombinant DNA Research Involving Animals</i>) supersedes Appendix G. Appendix Q defines Biosafety Levels 1 through 4 - <u>Animals</u>.</p>

Tabella. 14

Rifiuti

Il Decreto Legislativo n.206/2001, che disciplina l'impiego confinato dei MOGM, all'art.5, stabilisce che la valutazione dell'impiego confinato al fine di evitare i rischi per la salute umana e per l'ambiente, deve tenere in considerazione il problema dello smaltimento dei rifiuti e degli effluenti. Infatti, nell'Allegato IV "Misure di contenimento ed altre misure di protezione" tra i requisiti minimi e le misure necessarie per ciascun livello di contenimento in attività di laboratorio e per altre attività, vi sono delle indicazioni specifiche in materia che si riassumono di seguito, insieme ad altre indicazioni di interesse (ad esempio sulla necessità di un autoclave):

ATTIVITA'	SPECIFICHE		LIVELLI DI CONTENIMENTO			
			1	2	3	4
Laboratorio, Serre e camere di crescita, Stabulari (Tabelle I a, I b e I c)	8	Autoclave	Nel sito	Nell'edificio	Sul piano (4)	In laboratorio – a doppia entrata
	20	Inattivazione dei MOGM negli effluenti dei lavandini, degli scarichi o delle docce, se presenti, o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Necessario	Necessario
	21	Inattivazione dei MOGM nei materiali e nei rifiuti contaminati	Se necessario	Necessario	Necessario	Necessario
Diverse da quelle di laboratorio (Tabella II)	22	Inattivazione dei MOGM negli effluenti dei lavandini e delle docce o in effluenti analoghi	Non necessario	Non necessario	Se necessario	Necessario
	23	Inattivazione dei MOGM nei materiali e nei rifiuti contaminati compresi gli effluenti di processo prima dello scarico finale	Se necessario	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati	Necessario, con mezzi convalidati
(4) In base a procedure convalidate che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio e che forniscano un livello di protezione equivalente						

Tabella. 15

Va inoltre ricordato che la gestione dei rifiuti in generale è disciplinata dal D. Lgs n.152/2006, parte IV, mentre non si applica ai MOGM, per esplicita esclusione dal campo di applicazione, il DPR 15 luglio 2003 "Regolamento recante disciplina della gestione dei rifiuti sanitari [...]". Quest'ultimo regolamento contiene in particolare le modalità di gestione dei rifiuti sanitari a rischio infettivo e quindi, in ambito sanitario, influenzerà sia direttamente le modalità di gestione dei rifiuti non contenenti o contaminati da MOGM, sia indirettamente la fase finale di gestione dei rifiuti MOGM ove questi siano inattivati per mezzo di un'autoclave che non sia all'interno del laboratorio, ma perlomeno sul piano, ovvero fino al livello di contenimento 3, e dunque al servizio anche di altri settori sanitari all'interno della stessa struttura.

Innanzitutto nella Tabella. 15 si osserva la distinzione tra effluenti e rifiuti: i primi se convogliati ad uno scarico in condotta (pretrattamento e/o fognatura) rientrano nella disciplina delle acque (scarichi), mentre se confinati in un volume definito e movimentabile (serbatoi o recipienti di qualsiasi genere), rientrano comunque nella disciplina dei rifiuti (si tratta di un orientamento oramai consolidato).

Altri riferimenti utili sono costituiti dalle norme europee:

UNI EN 12461:2000 "Biotecnologie – Processi su larga scala e produzione – Linee guida sul trattamento, l'inattivazione ed il controllo dei rifiuti";

UNI EN 12740:2001 "Biotecnologie – Laboratori di ricerca, sviluppo ed analisi – Linee guida per il trattamento, l'inattivazione ed il controllo dei rifiuti".

Classificazione dei rifiuti

Per poter individuare i rifiuti prodotti durante l'uso confinato di MOGM, occorre fare riferimento alle attività nell'ambito delle quali tale uso trova applicazione, in quanto i rifiuti sono classificati primariamente in funzione della provenienza:

- attività sanitarie (ricerca medica e veterinaria, terapia genica, ecc.);
- agricoltura e agroindustria;
- processi chimici organici (biotecnologie in ambito farmaceutico o produzione di fitofarmaci, biocidi, cosmetici);
- operazioni di tipo ambientale (trattamento di reflui e bonifiche di siti inquinati).

I rifiuti derivanti da queste attività sono, per esplicita dichiarazione del D. Lgs 152/2006, rifiuti speciali [art.184, comma 3, lett. a), c), g) e h)] e come tali devono essere gestiti.

Difficilmente l'impiego confinato dei MOGM potrà produrre rifiuti assimilabili agli urbani, in quanto lo stesso D. Lgs n.152/2006 prevede che possano essere assimilati ai rifiuti urbani i rifiuti non pericolosi provenienti da locali e luoghi non adibiti ad uso civile di abitazione se rispondenti a criteri qualitativi e quantitativi che determinano i singoli comuni e che comunque non possano di norma essere assimilati ai rifiuti urbani quelli provenienti dalle aree produttive, salvo i rifiuti prodotti negli uffici, nelle mense, negli spacci, nei bar e nei locali a servizio dei lavoratori o comunque aperti al pubblico.

Soprattutto in ambito sanitario possono inoltre essere prodotti rifiuti contaminati da MOGM, anche radioattivi i quali sono però esclusi dalla disciplina ordinaria dei rifiuti in quanto regolamentati da normativa speciale, ovvero dal D. Lgs n.230/1995, come modificato ed integrato dal D. Lgs n.241/2000. Sono definiti rifiuti radioattivi quei materiali di scarto che contengono o sono contaminati da radionuclidi e la cui concentrazione o attività specifica è maggiore di un valore di soglia. In particolare, il decreto sopra citato stabilisce che i rifiuti radioattivi possono essere smaltiti nell'ambiente, conferiti a terzi e riciclati o riutilizzati, come rifiuti speciali, qualora rispettino le seguenti condizioni:

- tempo di dimezzamento < 75 giorni;
- concentrazione di radionuclidi ≤ 1 Bq/g;

fissando così di fatto, le condizioni di soglia di radioattività per i rifiuti.

Per quanto riguarda le caratteristiche di pericolosità, occorre individuare le tipologie di rifiuti prodotti durante l'uso confinato. Un elenco esemplificativo della merceologia dei rifiuti che possono essere prodotti da un laboratorio di ricerca di una struttura sanitaria, è riportato nella Tabella. 16:

Organici biologici	Cartacei	Plastica leggera	Plastica pesante	Metalli	Tessili	Cuoio e gomme	Liquidi
asporti chirurgici	carta da stampa, cartone da imballo, carta uso ufficio	involucri contenitori	provette, siringhe, pipette	aghi	garze	guanti monouso	sangue
sangue coagulato	tovagliolini da pulizia			strumenti	mascherine facciali	pompette manuali	urina
terreni solidi di coltura					ovatta		brodo coltura

Tabella. 16

Uno schema della classificazione dei rifiuti, sempre con riferimento all'ambito sanitario è riportata nello schema seguente in cui si collega la tipologia del rifiuto prodotto al relativo regime giuridico che ne "guida" le modalità di gestione.

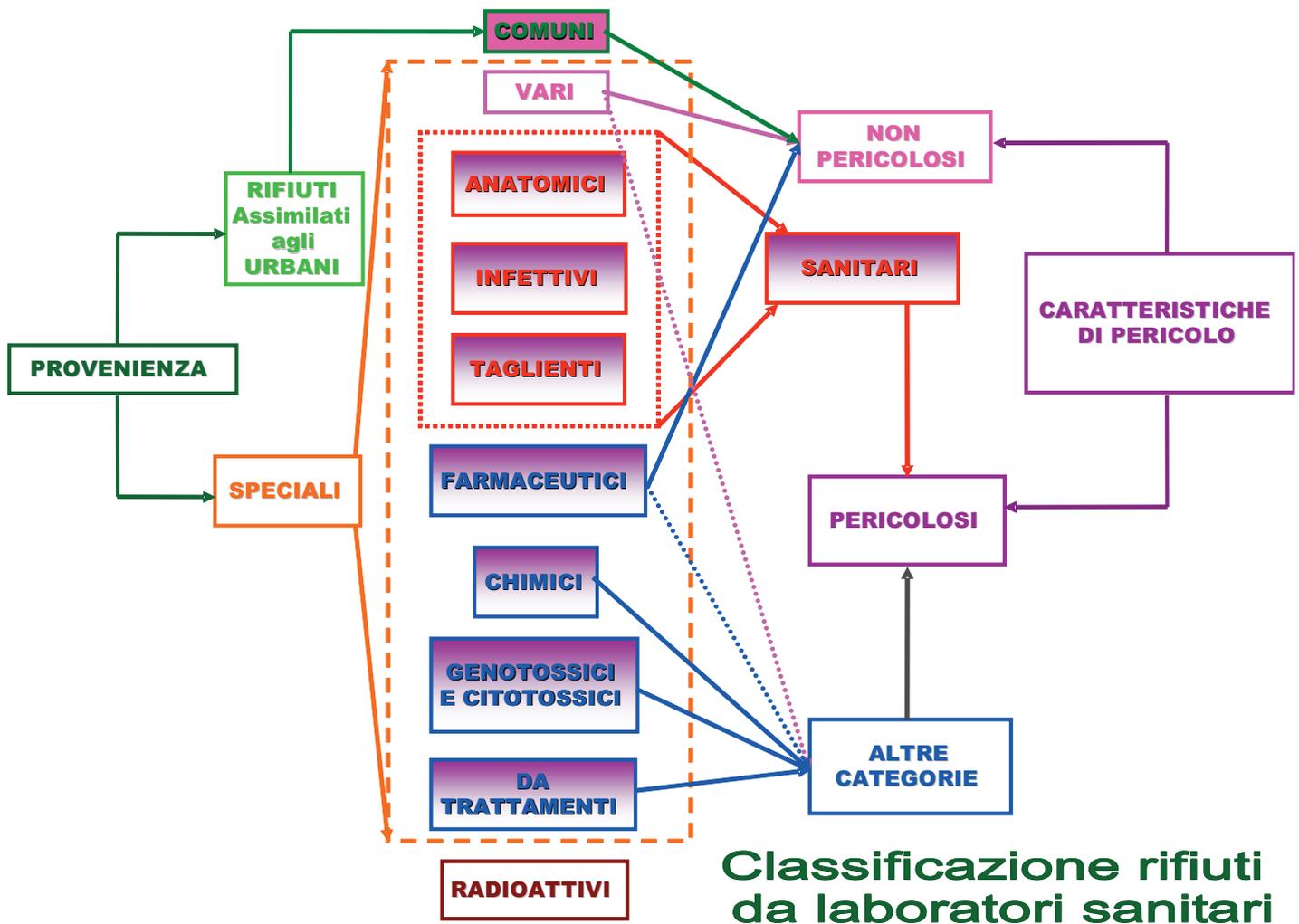


Figura. 12

Per codificare e classificare un rifiuto si deve fare riferimento all'Allegato D del D. Lgs. n.152/2006 parte IV che riporta l'Elenco Europeo dei Rifiuti e dà indicazioni per la sua lettura ed in particolare:

"[...] Diversi tipi di rifiuto inclusi nell'elenco sono definiti specificatamente mediante un codice a sei cifre per ogni singolo rifiuto e i corrispondenti codici a quattro e a due cifre per i rispettivi capitoli.

Di conseguenza, per identificare un rifiuto nell'elenco occorre procedere come segue:

3.1. Identificare la fonte che genera il rifiuto consultando i titoli dei capitoli da 01 a 12 o da 17 a 20 per risalire al codice a sei cifre riferito al rifiuto in questione, ad eccezione dei codici dei suddetti capitoli che terminano con le cifre 99. È possibile che un determinato impianto o stabilimento debba classificare le proprie attività riferendosi a capitoli diversi. Per esempio un fabbricante di automobili può reperire i rifiuti che produce sia nel capitolo 12 (rifiuti dalla lavorazione e dal trattamento superficiale di metalli), che nel capitolo 11 (rifiuti inorganici contenenti metalli provenienti da trattamento e ricopertura di metalli) o ancora nel capitolo 08 (rifiuti da uso di rivestimenti), in funzione delle varie fasi della produzione.

Nota: I rifiuti di imballaggio oggetto di raccolta differenziata (comprese combinazioni di diversi materiali di imballaggio) vanno classificati alla voce 15 01 e non alla voce 20 01.

3.2. Se nessuno dei codici dei capitoli da 01 a 12 o da 17 a 20 si presta per la classificazione di un determinato rifiuto, occorre esaminare i capitoli 13, 14 e 15 per identificare il codice corretto.

3.3. Se nessuno di questi codici risulta adeguato, occorre definire il rifiuto utilizzando i codici di cui al capitolo 16.

3.4. Se un determinato rifiuto non è classificabile neppure mediante i codici del capitolo 16, occorre utilizzare il codice 99 (rifiuti non altrimenti specificati) preceduto dalle cifre del capitolo che corrisponde all'attività identificata al punto 3.1. (si fa notare che l'utilizzo del codice 99 è esclusivamente residuale e che molte autorità competenti richiedono comunque una specificazione della tipologia nei documenti amministrativi riguardanti rifiuti con tale codice).

4. I rifiuti contrassegnati nell'elenco con un asterisco "*" sono rifiuti pericolosi ai sensi della direttiva 91/689/CEE relativa ai rifiuti pericolosi e ad essi si applicano le disposizioni della medesima direttiva, a condizione che non trovi applicazione l'articolo 1, paragrafo 5 (esclusione dei rifiuti domestici).

Si ritiene che tali rifiuti presentino una o più caratteristiche indicate nell'Allegato III della direttiva 91/689/CEE"... che è stato trasposto nell'Allegato I alla parte IV del D. Lgs. n.152/2006, "Caratteristiche di pericolo per i rifiuti":

H1 "Esplosivo": sostanze e preparati che possono esplodere per effetto della fiamma o che sono sensibili agli urti e agli attriti più del dinitrobenzene;

H2 “Comburente”: sostanze e preparati che, a contatto con altre sostanze, soprattutto se infiammabili, presentano una forte reazione esotermica;

H3-A “Facilmente infiammabile”: sostanze e preparati

- liquidi il cui punto di infiammabilità è inferiore a 21° C (compresi i liquidi estremamente infiammabili) o
- che a contatto con l’aria, a temperatura ambiente e senza apporto di energia, possono riscaldarsi e infiammarsi,
- solidi che possono facilmente infiammarsi per la rapida azione di una sorgente di accensione e che continuano a bruciare o a consumarsi anche dopo l’allontanamento della sorgente di accensione, o
- gassosi che si infiammano a contatto con l’aria a pressione normale, o
- che, a contatto con l’acqua o l’aria umida, sprigionano gas facilmente infiammabili in quantità pericolose;

H3-B “Infiammabile”: sostanze e preparati liquidi il cui punto di infiammabilità è pari o superiore a 21° C e inferiore o pari a 55° C;

H4 “Irritante”: sostanze e preparati non corrosivi il cui contatto immediato, prolungato o ripetuto con la pelle o le mucose può provocare una reazione infiammatoria;

H5 “Nocivo”: sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute di gravità limitata;

H6 “Tossico”: sostanze e preparati (comprese le sostanze e i preparati molto tossici) che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute gravi, acuti o cronici e anche la morte;

H7 **“Cancerogeno”**: sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre il cancro o aumentarne la frequenza – per maggior chiarezza si riportano in Tabella. 17 le categorie di cancerogenicità previste dalla normativa vigente su classificazione ed etichettatura delle sostanze pericolose:

CANCEROGENICITÀ			
CATEGORIA	DESCRIZIONE	SIMBOLO E INDICAZIONI PERICOLO	FRASI DI RISCHIO
Categoria 1	Sostanze note per gli effetti cancerogeni sull'uomo. Esistono prove sufficienti per stabilire un nesso causale tra l'esposizione dell'uomo alla sostanza e lo sviluppo di tumori	T (Tossico) 	R 45 (Può provocare il cancro) R 49 (Può provocare il cancro per inalazione)
Categoria 2	Sostanze che dovrebbero considerarsi cancerogene per l'uomo. Esistono elementi sufficienti per ritenere verosimile che l'esposizione dell'uomo alla sostanza possa provocare lo sviluppo di tumori in generale sulla base di: - adeguati studi a lungo termine effettuati su animali - altre informazioni specifiche	T (Tossico) 	R 45 (Può provocare il cancro) R 49 (Può provocare il cancro per inalazione)
Categoria 3	Sostanze da considerare con sospetto per i possibili effetti cancerogeni sull'uomo per le quali tuttavia le informazioni disponibili non sono sufficienti per procedere ad una valutazione soddisfacente. Esistono alcune prove ottenute da adeguati studi sugli animali che non bastano tuttavia per classificare la sostanza nella Categoria 2.	Xn (Nocivo) 	R 40 (Possibilità di effetti cancerogeni – prove insufficienti)

Tabella. 17

H8 “Corrosivo”: sostanze e preparati che, a contatto con tessuti vivi, possono esercitare su di essi un’azione distruttiva;

H9 “Infettivo”: sostanze contenenti microrganismi vitali o loro tossine, conosciute o ritenute per buoni motivi come cause di malattie nell’uomo o in altri organismi viventi;

H10 **“Teratogeno”** (ora **“Sostanza tossica per il ciclo riproduttivo”**): sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre malformazioni congenite non ereditarie o aumentarne la frequenza - per maggior chiarezza si riportano in Tabella. 18 le categorie di tossicità per il ciclo riproduttivo previste dalla normativa vigente su classificazione ed etichettatura delle sostanze pericolose:

TOSSICITÀ PER IL CICLO RIPRODUTTIVO

CATEGORIA	DESCRIZIONE	SIMBOLO E INDICAZIONI PERICOLO	FRASI DI RISCHIO
<p>Categoria 1</p>	<p><i>Sostanze che danneggiano la fertilità negli esseri umani</i> Esistono prove sufficienti per stabilire un nesso causale tra l'esposizione umana alla sostanza e un calo della fertilità. <i>Sostanze con effetti tossici sullo sviluppo umano</i> Esistono prove sufficienti per stabilire un nesso causale tra l'esposizione umana alla sostanza e successivi effetti tossici nel corso dello sviluppo della progenie.</p>	<p>T (Tossico)</p> 	<p><i>Sostanze che danneggiano la fertilità negli esseri umani</i> R60 Può ridurre la fertilità <i>Sostanze che hanno effetti tossici sullo sviluppo</i> R61 Può danneggiare i bambini non ancora nati</p>
<p>Categoria 2</p>	<p><i>Sostanze che dovrebbero essere considerate in grado di danneggiare la fertilità negli esseri umani</i> Esistono prove evidenti per sospettare che l'esposizione umana alla sostanza possa incidere sulla fertilità sulla base di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - prove evidenti di danno della fertilità negli animali in assenza di effetti tossici, oppure elementi comprovanti danni della fertilità riscontrati a livelli di dose approssimativamente analoghi a quelli correlati ad altri effetti tossici, ma che non ne rappresentano una conseguenza secondaria aspecifica, - altri dati pertinenti. <p><i>Sostanze che dovrebbero essere considerate in grado di provocare effetti tossici sullo sviluppo umano</i> Esistono prove sufficienti per sospettare che l'esposizione umana alla sostanza possa dar luogo ad effetti tossici per lo sviluppo, sulla base in genere di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - risultati inequivocabili di adeguati studi su animali in cui gli effetti osservati comparivano in assenza di segni di forte tossicità materna 	<p>T (Tossico)</p> 	<p><i>Sostanze da considerare potenzialmente in grado di danneggiare la fertilità negli esseri umani</i> R60 Può ridurre la fertilità <i>Sostanze da considerare potenzialmente in grado di provocare effetti tossici sullo sviluppo degli esseri umani</i> R61 Può danneggiare i bambini non ancora nati</p>

	<p>oppure a livelli di dose approssimativamente analoghi a quelli correlati ad altri effetti tossici, pur non rappresentandone una conseguenza secondaria aspecifica,</p> <ul style="list-style-type: none"> - altri dati pertinenti. 		
Categoria 3	<p><i>Sostanze che potrebbero avere effetti sulla fertilità umana</i> In genere le sostanze si reputano tali sulla base di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - risultati di adeguati studi su animali che forniscono prove sufficientemente valide da corroborare il forte sospetto di danno della fertilità in assenza di altri effetti tossici, oppure elementi comprovanti danni della fertilità riscontrati a livelli di dose approssimativamente analoghi a quelli correlati ad altri effetti tossici, ma che non ne rappresentano una conseguenza secondaria aspecifica; tuttavia tali elementi comprovanti sono insufficienti per classificare la sostanza nella categoria 2, - altri dati pertinenti. <p><i>Sostanze che potrebbero produrre alterazioni negli esseri umani a causa dei loro probabili effetti tossici sullo sviluppo</i> In genere le sostanze si reputano tali sulla base di:</p> <ul style="list-style-type: none"> - risultati di adeguati studi su animali che forniscono prove sufficientemente valide da corroborare il forte sospetto di tossicità sullo sviluppo in assenza di segni di forte tossicità materna a livelli di dose approssimativamente analoghi a quelli correlati ad altri effetti tossici, ma che non ne rappresentano una conseguenza secondaria aspecifica; tuttavia i riscontri sono insufficienti per classificare la sostanza nella categoria 2, - altri dati pertinenti. 	<p>Xn (Nocivo)</p> 	<p><i>Sostanze che potrebbero avere effetti sulla fertilità umana</i> R62 Possibile rischio di ridotta fertilità <i>Sostanze che potrebbero produrre danni sugli esseri umani a causa dei loro probabili effetti tossici sullo sviluppo</i> R63 Possibile rischio di danni ai bambini non ancora nati</p>

Tabella. 18

H11 **“Mutageno”**: sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre difetti genetici ereditari o aumentarne la frequenza - per maggior chiarezza si riportano in Tabella. 19 le categorie di mutagenicità previste dalla normativa vigente su classificazione ed etichettatura delle sostanze pericolose:

MUTAGENICITÀ			
CATEGORIA	DESCRIZIONE	SIMBOLO E INDICAZIONI PERICOLO	FRASI DI RISCHIO
Categoria 1	Sostanze note per gli effetti mutageni sull'uomo. Esistono prove sufficienti per stabilire un nesso causale tra l'esposizione dell'uomo ad esse e l'insorgenza di alterazioni genetiche ereditarie.	T (Tossico) 	R46: Può provocare alterazioni genetiche ereditarie
Categoria 2	Sostanze da considerare mutagene per l'uomo. Esistono prove sufficienti per ritenere verosimile che l'esposizione umana possa provocare lo sviluppo di alterazioni genetiche ereditarie, in generale sulla base di: - adeguati studi su animali - altre informazioni specifiche	T (Tossico) 	R46: Può provocare alterazioni genetiche ereditarie
Categoria 3	Sostanze da considerare con sospetto per possibili effetti mutageni. Esistono prove ottenute da studi specifici sugli effetti mutageni ma non sono sufficienti per classificare la sostanza nella categoria 2.	Xn (Nocivo) 	R68*: Può provocare effetti irreversibili * introdotta col 28° APT (in precedenza era adottata R40)

Tabella. 19

- H12 Sostanze e preparati che, a contatto con l'acqua, l'aria o un acido, sprigionano un gas tossico o molto tossico;
H13 Sostanze e preparati suscettibili, dopo eliminazione, di dare origine in qualche modo ad un'altra sostanza, ad esempio ad un prodotto di lisciviazione avente una delle caratteristiche sopra elencate;
H14 “Ecotossico”: sostanze e preparati che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più settori dell'ambiente.

Note

- L'attribuzione delle caratteristiche di pericolo “tossico” (e “molto tossico”), “nocivo”, “corrosivo” e “irritante” è effettuata secondo i criteri stabiliti nell'Allegato VI, parte I. A e parte II. B della direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose, nella versione modificata dalla direttiva 79/831/CEE del Consiglio.
- Per quanto concerne l'attribuzione delle caratteristiche “cancerogeno”, “teratogeno” e “mutageno” e riguardo all'attuale stato delle conoscenze, precisazioni supplementari figurano nella guida per la classificazione e l'etichettatura di cui all'Allegato VI (parte II D) della direttiva 67/548/CEE, nella versione modificata dalla direttiva 83/467/CEE della Commissione.

Metodi di prova

I metodi di prova sono intesi a conferire un significato specifico alle definizioni di cui all'Allegato III.

I metodi da utilizzare sono quelli descritti nell'Allegato V della direttiva 67/548/CEE, nella versione modificata dalla direttiva 84/449/CEE della Commissione o dalle successive direttive della Commissione che adeguano al progresso tecnico la direttiva 67/548/CEE. Questi metodi sono basati sui lavori e sulle raccomandazioni degli organismi internazionali competenti, in particolare su quelli dell'OCSE.

Si ritiene inoltre che i rifiuti classificati come pericolosi in riferimento ai codici da H3 a H8 e ai codici H10 e H11 (*) del medesimo Allegato (Allegato III della direttiva 91/689/CEE) presentino una o più delle seguenti caratteristiche (**):

punto di infiammabilità ≤ 55 °C;

- una o più sostanze classificate come molto tossiche in concentrazione totale $\geq 0,1\%$;
- una o più sostanze classificate come tossiche in concentrazione totale $\geq 3\%$;
- una o più sostanze classificate come nocive in concentrazione totale $\geq 25\%$;

- una o più sostanze corrosive classificate come R35 in concentrazione totale $\geq 1\%$;
- una o più sostanze corrosive classificate come R34 in concentrazione totale $\geq 5\%$;
- una o più sostanze irritanti classificate come R41 in concentrazione totale $\geq 10\%$;
- una o più sostanze irritanti classificate come R36, R37, R38 in concentrazione totale $\geq 20\%$;
- una sostanza riconosciuta come cancerogena (categorie 1 o 2) in concentrazione $\geq 0,1\%$;
- una sostanza riconosciuta come cancerogena (categoria 3) in concentrazione $\geq 1\%$;
- una sostanza riconosciuta come tossica per il ciclo riproduttivo (categorie 1 o 2) classificata come R60 o R61 in concentrazione $\geq 0,5\%$;
- una sostanza riconosciuta come tossica per il ciclo riproduttivo (categoria 3) classificata come R62 o R63 in concentrazione $\geq 5\%$;
- una sostanza mutagena della categoria 1 o 2 classificata come R46 in concentrazione $\geq 0,1\%$;
- una sostanza mutagena della categoria 3 classificata come R40 in concentrazione $\geq 1\%$;

(*) L'espressione "sostanza tossica per il ciclo riproduttivo" è stata introdotta con la direttiva 92/32/CEE recante settima modifica alla direttiva 67/548/CEE. Il termine "teratogena" è stato sostituito dall'espressione "sostanza tossica per il ciclo riproduttivo", in quanto più confacente, dando una definizione più precisa, senza tuttavia modificare il concetto alla base. Corrisponde dunque al codice H10 dell'Allegato III della direttiva 91/689/CEE.

(**) La classificazione e i numeri R si basano sulla direttiva 67/548/CEE concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose (G.U.L 196 del 16/8/1967, pag. 1) e successive modifiche. I limiti di concentrazione si riferiscono a quelli specificati nella direttiva 88/379/CEE per il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi (G.U.L 187 del 16/7/1988, pag. 14) e successive modifiche, mentre per la mutagenicità vale il criterio sopra specificato.

Sono inoltre riportate le seguenti **definizioni**:

sostanza pericolosa: "qualsiasi sostanza che è o sarà classificata come pericolosa ai sensi della direttiva 67/548/CE e successive modifiche";

metallo pesante: "qualunque composto di antimonio, arsenico, cadmio, cromo (VI), rame, piombo, mercurio, nichel, selenio, tellurio, tallio e stagno, anche quando tali metalli appaiono in forme metalliche classificate come pericolose".

Per le caratteristiche di pericolo H1, H2, H9, H12, H13 e H14 mancano i criteri di riferimento sia a livello comunitario che a livello nazionale, e si ritiene che la classificazione di pericolosità possa comunque essere correttamente effettuata applicando i criteri di cui sopra.

I criteri di individuazione delle sostanze pericolose presenti nei rifiuti, sono quelli definiti nella direttiva 88/379/CEE (preparati pericolosi) e successive modifiche. La direttiva 91/689/CEE relativa ai rifiuti pericolosi, prevedeva, infatti, ai fini dell'attribuzione di alcune caratteristiche di pericolo, un'assimilazione dei rifiuti pericolosi ai preparati pericolosi. In soli due casi la decisione che ha introdotto il nuovo Elenco Europeo dei Rifiuti non si allinea con la direttiva 88/379/CEE, come modificata dalla direttiva 99/45/CE e, in particolare:

- la caratteristica "sensibilizzante", prevista dalla direttiva sui preparati pericolosi, non riconducibile a nessuna delle caratteristiche di pericolo individuate nella direttiva 91/689/CEE;
- la caratteristica "pericoloso per l'ambiente", di cui all'Allegato III, parte A e B della direttiva 99/45/CE, che si potrebbe assimilare alla caratteristica H14 "ecotossico" riconducibile alle:
 - a) frasi di rischio R50, R51, R52, R53 (ambiente acquatico) ed R59 (ambiente non acquatico), per le quali sono definite le modalità di calcolo e i limiti di concentrazione per la classificazione del preparato;
 - a) frasi di rischio R54, R55, R56, R57 ed R58 (ambiente terrestre), per le quali non sono ancora definiti i criteri particolareggiati per l'uso

Ulteriori criteri per la classificazione dei rifiuti si trovano nell'Allegato G "Categorie o tipi generici di rifiuti pericolosi elencati in base alla loro natura o all'attività che li ha prodotti (i rifiuti possono presentarsi sotto forma di liquido, di solido o di fango) (*)" e nell'Allegato H "Costituenti che rendono pericolosi i rifiuti dell'Allegato G.2 quando tali rifiuti possiedono le caratteristiche dell'Allegato I", di seguito riportati:

Allegato G.1

Rifiuti che presentano una qualsiasi delle caratteristiche elencate nell'Allegato I e che consistono in (*in corsivo* sono riportate le voci di potenziale interesse per l'uso confinato dei MOGM):

1. *Sostanze anatomiche: rifiuti di ospedali o provenienti da altre attività mediche*
2. *Prodotti farmaceutici, medicinali, prodotti veterinari*
3. *Prodotti per la protezione del legno*
4. *Biocidi e prodotti fitosanitari*
5. *Residui di prodotti utilizzati come solventi*
6. *Sostanze organiche alogenate non utilizzate come solventi, escluse le sostanze polimerizzate inerti*
7. *Sali per rinvenimento contenenti cianuri*

8. Oli e sostanze oleose minerali (ad esempio fanghi di lavorazione, ecc.)
9. Miscugli olio/acqua o idrocarburo/acqua, emulsioni
10. Sostanze contenenti PCB e/o PCT (ad esempio isolanti elettrici, ecc.)
11. Sostanze bituminose provenienti da operazioni di raffinazione, distillazione o pirolisi (ad esempio residui di distillazione, ecc.)
12. *Inchiostri, coloranti, pigmenti, pitture, lacche, vernici*
13. Resine, lattici, plastificanti, colle/adesivi
14. *Sostanze chimiche non identificate e/o nuove provenienti da attività di ricerca, di sviluppo o di insegnamento, i cui effetti sull'uomo e/o sull'ambiente non sono noti (ad esempio rifiuti di laboratorio, ecc.)*
15. Prodotti pirotecnici ed altre sostanze esplosive
16. Prodotti di laboratori fotografici
17. Qualunque materiale contaminato da un prodotto della famiglia dei dibenzofurani policlorurati [PCDF]
18. Qualunque materiale contaminato da un prodotto della famiglia delle dibenzoparadiossine policlorurate [PCDD]

Allegato G.2

Rifiuti contenenti uno qualunque dei costituenti elencati nell'Allegato H, aventi una delle caratteristiche elencate nell'Allegato I e consistenti in (in corsivo sono riportate le voci di potenziale interesse per l'uso confinato dei MOGM):

19. Saponi, corpi grassi, cere di origine animale o vegetale
20. *Sostanze organiche non alogenate non utilizzate come solventi*
21. *Sostanze inorganiche senza metalli, né composti metallici*
22. Scorie e/o ceneri
23. Terre, argille o sabbie, compresi i fanghi di dragaggio
24. Sali per rinvenimento non contenenti cianuri
25. Polveri metalliche
26. Materiali catalitici usati
27. Liquidi o fanghi contenenti metalli o composti metallici
28. *Rifiuti provenienti da trattamenti disinquinanti (ad esempio: polveri di filtri dell'aria, ecc.) salvo quelli previsti ai punti 29, 30 e 33*
29. Fanghi provenienti dal lavaggio di gas
30. Fanghi provenienti dagli impianti di depurazione dell'acqua
31. Residui di decarbonazione
32. Residui di colonne scambiatrici di ioni
33. Fanghi residuati non trattabili o non utilizzabili in agricoltura
34. *Residui della pulizia di cisterne e/o di materiale*
35. *Materiale contaminato*
36. *Recipienti contaminati (ad esempio: imballaggi, bombole di gas, ecc.) che abbiano contenuto uno o più dei costituenti elencati nell'Allegato H*
37. Accumulatori e pile elettriche
38. Oli vegetali
39. Oggetti provenienti da una raccolta selettiva di rifiuti domestici e aventi una delle caratteristiche elencate nell'Allegato I
40. *Qualunque altro rifiuto contenente uno qualunque dei costituenti elencati nell'Allegato H e aventi una delle caratteristiche elencate nell'Allegato I*

(*) alcune ripetizioni rispetto alle voci dell'Allegato H sono fatte intenzionalmente

Allegato H

- C1. Berillio, composti del berillio
- C2. Composti del vanadio
- C3. Composti del cromo esavalente
- C4. Composti del cobalto
- C5. Composti del nichel
- C6. Composti del rame
- C7. Composti dello zinco
- C8. Arsenico, composti dell'arsenico
- C9. Selenio, composti del selenio
- C10. Composti dell'argento
- C11. Cadmio, composti del cadmio
- C12. Composti dello stagno
- C13. Antimonio, composti dell'antimonio
- C14. Tellurio, composti del tellurio
- C15. Composti del bario, ad eccezione del solfato di bario
- C16. Mercurio, composti del mercurio
- C17. Tallio, composti del tallio
- C18. Piombo, composti del piombo

- C19. Solfuri inorganici
- C20. Composti inorganici del fluoro, escluso il fluoruro di calcio
- C21. Cianuri inorganici
- C22. I seguenti metalli alcalini o alcalino-terrosi: litio, sodio, potassio, calcio, magnesio sotto forma non combinata
- C23. Soluzioni acide o acidi sotto forma solida
- C24. Soluzioni basiche o basi sotto forma solida
- C25. Amianto (polveri e fibre)
- C26. Fosforo, composti del fosforo esclusi i fosfati minerali
- C27. Metallocarbonili

Rifiuti aventi come costituenti:

- C28. *Perossidi*
- C29. *Clorati*
- C30. *Perclorati*
- C31. *Azoturi*
- C32. *PCB e/o PCT*
- C33. *Composti farmaceutici o veterinari*
- C34. *Biocidi e sostanze fitosanitarie (ad esempio antiparassitari, ecc.)*
- C35. *Sostanze infettive*
- C36. *Oli di creosoto*
- C37. *Isocianati, tiocianati*
- C38. *Cianuri organici (ad esempio nitrili, ecc.)*
- C39. *Fenoli, composti fenolati*
- C40. *Solventi alogenati*
- C41. *Solventi organici, esclusi i solventi alogenati*
- C42. *Composti organo-alogenati, escluse le sostanze polimerizzate inerti e le altre sostanze indicate nel presente Allegato*
- C43. *Composti aromatici, composti organici policiclici ed eterociclici*
- C44. *Ammine alifatiche*
- C45. *Ammine aromatiche*
- C46. *Eteri*
- C47. *Sostanze di carattere esplosivo, escluse le sostanze indicate in altri punti dell'Allegato*
- C48. *Composti organici dello zolfo*
- C49. *Qualsiasi prodotto della famiglia dei dibenzofurani policlorati [PCDF]*
- C50. *Qualsiasi prodotto della famiglia delle dibenzo-paradiossine policlorate [PCDD]*
- C51. *Idrocarburi e loro composti ossigenati azotati e/o solforati non altrimenti indicati nel presente Allegato*

Tali allegati offrono preziose indicazioni per poter identificare la corretta classificazione dei rifiuti, per i quali il solo riferimento alla normativa sulla classificazione ed etichettatura delle sostanze pericolose non sempre è sufficiente.

Per quanto riguarda i PCB, la cui presenza è piuttosto diffusa a causa del massiccio utilizzo che ne fu fatto in apparecchiature elettriche, si ritiene utile riportarne la definizione contenuta nel D. Lgs. n.209/99 ("Attuazione della direttiva 96/59/CE relativa allo smaltimento dei policlorodifenili e dei policlorotrifenili"), secondo cui per PCB si intendono oltre ai policlorodifenili, i policlorotrifenili, il monometiltetraclorodifenilmetano, il monometildiclorodifenilmetano, il monometildibromodifenil-metano e ogni loro miscela che presenti una concentrazione complessiva superiore allo 0,005% in peso (50 ppm). Quest'ultima assimilazione è particolarmente importante in quanto è coerente con il limite di concentrazione specifico per la classificazione dei preparati con frase di rischio R33 (pericolo di effetti cumulativi) pari a 0,005% previsto dalla normativa vigente e con il limite previsto dal Regolamento n.850/2004/CE relativo agli inquinanti organici persistenti o "POP", come modificato dal Regolamento 1195/2006/CE, per farli rientrare nelle disposizioni specifiche per i "POP waste". Ne discende che i rifiuti contenenti PCB in concentrazione superiore ai 50 ppm sono da considerare pericolosi, come del resto indicato anche dalla Convenzione di Basilea sul controllo dei movimenti oltre frontiera dei rifiuti pericolosi e sulla loro eliminazione.

Infine si ritiene altrettanto utile fare presente che le disposizioni specifiche del Regolamento n.850/2004/CE si applicano ai rifiuti che contengono, oltre ai PCB, anche i seguenti inquinanti organici persistenti, tra cui molti insetticidi, al di sopra delle soglie definite dallo stesso Regolamento:

- Aldrin
- Clordano
- Dieldrin
- Eldrin
- Eptacloro
- Esaclorobenzene
- Mirex
- Toxafene
- DDT
- Clordecone
- Dibenzodiossine e dibenzofurani policlorurati (PCDD/PCDF)

- Esabromobifenile
- HCH, compreso il lindano

Per i rifiuti prodotti dal settore sanitario e veterinario o da attività di ricerca collegate, esiste un capitolo dedicato **dell'Elenco europeo dei Rifiuti** che si riporta di seguito:

- 18 *Rifiuti prodotti dal settore sanitario e veterinario o da attività di ricerca collegate (tranne i rifiuti di cucina e di ristorazione non direttamente provenienti da trattamento terapeutico)*
- 18 01 *rifiuti dai reparti di maternità e rifiuti legati a diagnosi, trattamento e prevenzione delle malattie negli esseri umani*
- 18 01 01 oggetti da taglio (eccetto 18 01 03)
- 18 01 02 parti anatomiche ed organi incluse le sacche per il plasma e le riserve di sangue (tranne 18 01 03)
- 18 01 03* rifiuti che devono essere raccolti e smaltiti applicando precauzioni particolari per evitare infezioni
- 18 01 04 rifiuti che non devono essere raccolti e smaltiti applicando precauzioni particolari per evitare infezioni (es. bende, ingessature, lenzuola, indumenti monouso, assorbenti igienici)
- 18 01 06* sostanze chimiche pericolose o contenenti sostanze pericolose
- 18 01 07 sostanze chimiche diverse da quelle di cui alla voce 18 01 06
- 18 01 08* medicinali citotossici e citostatici
- 18 01 09 medicinali diversi da quelli di cui alla voce 18 01 08
- 18 01 10* rifiuti di amalgama prodotti da interventi odontoiatrici
- 18 02 *rifiuti legati alle attività di ricerca e diagnosi, trattamento e prevenzione delle malattie negli animali.*
- 18 02 01 oggetti da taglio (eccetto 18 02 02)
- 18 02 02* rifiuti che devono essere raccolti e smaltiti applicando precauzioni particolari per evitare infezioni
- 18 02 03 rifiuti che non devono essere raccolti e smaltiti applicando precauzioni particolari per evitare infezioni
- 18 02 05* sostanze chimiche pericolose o contenenti sostanze pericolose
- 18 02 06 sostanze chimiche diverse da quelle di cui alla voce 18 02 05
- 18 02 07* medicinali citotossici e citostatici
- 18 02 08 medicinali diversi da quelli di cui alla voce 18 02 07

Altre tipologie di rifiuti che possono essere prodotti nell'uso confinato dei MOGM e potenzialmente contaminati, potrebbero indicativamente afferire alle seguenti categorie:

- 02 *Rifiuti prodotti da agricoltura, orticoltura, acquicoltura, selvicoltura, caccia e pesca, trattamento e preparazione di alimenti*
- 02 01 *rifiuti prodotti da agricoltura, orticoltura, acquicoltura, selvicoltura, caccia e pesca*
- 07 *Rifiuti dei processi chimici organici*
- 07 05 *rifiuti dalla produzione, formulazione, fornitura ed uso di prodotti farmaceutici*
- 07 06 *rifiuti dalla produzione, formulazione, fornitura ed uso di grassi, lubrificanti, saponi, detergenti, disinfettanti e cosmetici*
- 14 *Solventi organici, refrigeranti e propellenti di scarto*
- 15 *Rifiuti di imballaggio, assorbenti, stracci, materiali filtranti e indumenti protettivi (non specificati altrimenti)*
- 19 *Rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti, impianti di trattamento delle acque reflue fuori sito, nonché dalla potabilizzazione dell'acqua e dalla sua preparazione per uso industriale*
- 19 05 *Rifiuti prodotti dal trattamento aerobico di rifiuti solidi*
- 19 06 *Rifiuti prodotti dal trattamento anaerobico di rifiuti*
- 19 13 *Rifiuti prodotti dalle operazioni di bonifica di terreni e risanamenti delle acque di falda*

L'infettività è una delle caratteristiche di pericolo per cui mancano i criteri di riferimento, sia a livello comunitario che a livello nazionale, per cui l'assegnazione di tale caratteristica è effettuata esclusivamente sulla base della provenienza e della valutazione soggettiva del produttore del rifiuto.

È sempre consigliata l'inattivazione dei MOGM, potenziali contaminanti del rifiuto o dell'effluente.

Sono inoltre oggetto di disposizioni specifiche le seguenti tipologie di rifiuti:

- i veicoli fuori uso (VFU) – d.lgs. n.209/2003 e s.m.i.
- i rifiuti contenenti amianto (RCA) – DM n.248/2004
- i rifiuti di apparecchiature elettriche ed elettroniche (RAEE) – d.lgs. n.151/2005 e s.m.i.;

Infine si segnalano le recenti modifiche normative intervenute in ambito europeo che avranno progressivamente influenza sulla classificazione dei rifiuti:

- la recentissima pubblicazione in GUCE (31 dicembre 2008) del regolamento CE n.1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele (cosiddetto CLP) che modifica e, dal 1 giugno 2015, abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che modifica il regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH); in particolare ha abrogato l'Allegato I della direttiva 67/548/CEE sostituendolo con la tabella 3.2 dello stesso regolamento CLP.
- dal 12 dicembre 2010 le direttive 2006/12/CE relativa ai rifiuti e 91/689/CE relativa ai rifiuti pericolosi saranno integralmente sostituite dalla direttiva 2008/98/CE, comunque già recante modifiche alla 91/689/CE. La direttiva 2008/98/CE apporta le seguenti novità alle caratteristiche di pericolo:

- ✓ definisce la caratteristica H10 in conformità all'Allegato VI della direttiva 67/548/CE come consolidato dal 28° adeguamento, direttiva 2001/59/CE, ovvero "Tossico per la riproduzione";
- ✓ sostituisce la caratteristica H13 con la seguente, utilizzabile "se disponibili metodi di prova": "Sensibilizzanti": sostanze e preparati che, per inalazione o penetrazione cutanea, possono dar luogo ad una reazione di ipersensibilizzazione per cui una successiva esposizione alla sostanza o al preparato produce effetti nefasti caratteristici; attualmente infatti la decisione 2000/532/CE che ha introdotto l'Elenco Europeo dei Rifiuti non si allinea con la direttiva 88/379/CEE sui preparati pericolosi, come modificata dalla direttiva 99/45/CE, per tale categoria che non risulta riconducibile a nessuna delle caratteristiche di pericolo individuate nella direttiva 91/689/CE;
- ✓ l'attuale caratteristica H13 diventa H15.

Caratterizzazione e raccolta

Per la caratterizzazione si forniranno le indicazioni delle norme UNI EN 12461 e 12470, chiarendo che ove la norma UNI EN 12461 parla di "rifiuti gassosi" per omogeneità con la normativa italiana in materia di rifiuti è opportuno intendere effluenti gassosi o gas di scarico, che se emessi in atmosfera, sono esplicitamente esclusi dal campo di applicazione del D. Lgs n.152/2006 (Norme in materia di gestione dei rifiuti), in modo da non generare confusione. È ovvio che gli effluenti devono essere opportunamente trattati, come del resto previsto dal D. Lgs n.206/2001 e il materiale derivante dal trattamento degli effluenti (filtri, effluenti liquidi da lavaggi, polveri abbattute ecc.) dovrà essere gestito come rifiuto contaminato; inoltre, come per i liquidi, qualora gli effluenti gassosi siano contenuti in un volume definito e movimentabile (serbatoi o recipienti di qualsiasi genere) devono invece essere considerati "rifiuti".

Il primo passo è quello di identificare i rifiuti che presentano rischio biologico in modo da separarli fin dall'origine, quindi occorre individuare eventuali altre categorie di rischio rispetto le quali possono essere presenti incompatibilità tra i metodi di trattamento più opportuni. In tali casi (es. rifiuti contenenti materiali biologici e sostanze tossiche oppure radioattive) dovrebbe essere effettuata una valutazione del rischio per determinare quale rischio deve essere trattato prima.

La codifica dei rifiuti dovrebbe essere effettuata proprio sulla base del rischio prevalente.

Alcune indicazioni utili sulla gerarchia dei rischi sono fornite dagli accordi europei sul trasporto internazionale delle merci pericolose su strada (ADR) di cui si riportano le disposizioni di interesse nell'Appendice X. Ove sia comunque presente il rischio di infettività o di presenza di materiale contaminato da MOGM per cui è prescritta l'inattivazione, se il rifiuto viene codificato sulla base di altri rischi prevalenti, va indicata sul contenitore la necessità della sterilizzazione e/o dell'inattivazione.

La separazione dei rifiuti alla fonte ha il duplice obiettivo di:

- ridurre il rischio di esposizione ai microrganismi degli operatori che manipolano i rifiuti;
- prevenire la contaminazione di altri rifiuti riducendo la quantità complessiva dei rifiuti a rischio biologico prodotti.

Inoltre è opportuno rammentare che, ai sensi dell'art.187 del D. Lgs n.152/2006, è vietato miscelare categorie diverse di rifiuti pericolosi di cui all'Allegato G del decreto, ovvero rifiuti pericolosi con rifiuti non pericolosi, a meno che ciò non rechi alcun pregiudizio all'ambiente e sia finalizzato a rendere più sicuro il recupero e lo smaltimento.

La miscelazione deve essere comunque autorizzata.

Ai fini della corretta differenziazione dei rifiuti, che influenzerà anche l'eventuale deposito presso la struttura di produzione, può essere utile riportare lo schema di compatibilità chimica tra diversi gruppi di sostanze tradotto dall'IPPC Reference Document on Best Available Techniques on Waste Treatment Industries o WT BREF dell'agosto 2006 e riportato anche nelle Linee Guida per l'individuazione delle migliori tecniche disponibili per gli impianti di trattamento chimico-fisico e biologico dei rifiuti liquidi emanate con DM 9 gennaio 2007.

Per quanto riguarda il contenimento, è opportuno identificare i **contenitori** più adatti per i diversi rischi. I fattori da prendere in considerazione per la scelta sono i seguenti:

- stato e/o caratteristiche fisiche del rifiuto: liquido, viscoso, solido, tagliente (in tal caso resistenza alla perforazione e sufficiente rigidità);
- metodi e procedure previste per la manipolazione ed il trasporto (chiusura, presenza di maniglie, carrellatura, ecc.);
- metodi di trattamento (materiali compatibili con le condizioni previste, chiusura allentabile o rimovibile);
- decontaminazione del contenitore per il riutilizzo (materiali resistenti al trattamento senza perdita delle caratteristiche di impermeabilità, rigidità e robustezza);
- mezzi per identificare rifiuti diversi (possibilità di apporre scritte, etichette, colori);
- capacità di fornire il grado di contenimento fisico necessario (impermeabilità, robustezza, chiusura).

Le disposizioni del DPR 254/2003 per i rifiuti a rischio infettivo costituiscono comunque utile indicazione, purché ciò non sia in contrasto con i dettami del D. Lgs n.206/2001, ovvero tali rifiuti dovrebbero essere depositati, movimentati internamente, raccolti e trasportati utilizzando apposito imballaggio a perdere, anche flessibile, recante apposita scritta (ad es. “rifiuti pericolosi contaminati da Microrganismi Geneticamente Modificati”) ed il simbolo del rischio biologico o, se si tratta di rifiuti taglienti o pungenti, apposito imballaggio rigido a perdere, resistente alla puntura, recante analogo scritta con l’aggiunta della caratteristica specifica (“taglienti e pungenti”) contenuti entrambi nel secondo imballaggio rigido esterno, eventualmente riutilizzabile previa idonea disinfezione ad ogni ciclo d’uso ed anch’esso recante la scritta identificativa. Gli imballaggi esterni devono avere caratteristiche adeguate per resistere agli urti ed alle sollecitazioni provocate durante la loro movimentazione e trasporto, e devono essere realizzati in un colore idoneo a distinguerli dagli imballaggi utilizzati per il conferimento degli altri rifiuti.

In ogni caso devono essere previste formulazioni permanenti e leggibili o etichette scritte chiaramente e fissate in modo sicuro ed inalterabili. Il contenitore o la sua etichetta devono essere marcati con l’indicazione internazionale di rischio biologico. Devono inoltre essere presenti sistemi di chiusura o mezzi per sigillare il contenitore (chiusura integrale, fascette di plastica o di metallo, sistemi di sigillatura termica).

Nel caso di rifiuti infetti o comunque contaminati, ad elevato contenuto di umidità o che contengano liquidi l’utilizzo di materiale assorbente per contenere eventuali perdite accidentali, all’interno del contenitore interno, ne aumenta il peso, ma è prescritto dalle istruzioni d’imballaggio ADR, in quantità sufficiente da assorbire l’intero quantitativo di liquido presente; il contenitore deve comunque essere in grado di trattenere i liquidi, anche se destinato a rifiuti solidi.

Il contenitore deve essere realizzato con materiale permeabile agli agenti sterilizzanti se i contenuti devono essere sterilizzati con vapore o fumiganti gassosi, o comunque realizzati in modo che l’agente sterilizzante sia in grado di penetrare nel carico.

I contenitori dovrebbero essere conformi alle disposizioni nazionali per quanto attiene ai codici a colori, materiali, forma e dimensioni ed in particolare, *se destinati al trasporto all’esterno* dovrebbero essere conformi all’ADR (Appendice X). Ciò dovrebbe avvenire anche nel caso in cui i rifiuti vengano trattati, ovvero inattivati, all’esterno della struttura confinata.

I contenitori dovrebbero essere rimossi dalla struttura confinata quando sono stati riempiti in modo tale da non superare i limiti di sicurezza (non oltre $\frac{3}{4}$ del volume secondo il Manuale di biosicurezza nei laboratori, edizione italiana, AIREPSA 2005) oppure ad intervalli periodici, dovrebbero essere trasportati in un’area di deposito in attesa del trattamento e, in funzione del livello di rischio, decontaminati esternamente.

Deposito presso la struttura

Non è buona prassi mantenere i contenitori aperti per lunghi periodi, né tenerli depositati a lungo presso la struttura a seguito della chiusura e prima del trattamento di inattivazione.

Per i rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo il DPR 254/2003 prevede che la durata del deposito temporaneo non superi di norma i 5 giorni.

Le caratteristiche della zona adibita a deposito dovrebbero essere le seguenti:

- definizione chiara: per livelli di contenimento dal 2 in su, indicazione con il simbolo internazionale di rischio biologico e un cartello chiaro e permanente
- separazione dallo spazio di lavoro e dalle aree di consegna e deposito delle merci in arrivo
- accessibilità a carrelli e/o contenitori carrellati di trasporto dei rifiuti
- facilità di pulizia e decontaminazione
- sicurezza dell’accesso, ovvero possibilità di impedire l’accesso a persone non autorizzate e animali

Nel caso di piccole quantità (laboratori) potrebbe essere ammesso il deposito di contenitori rigidi e molto resistenti in un’area adeguata e definita oppure il deposito in frigoriferi o congelatori all’interno del laboratorio stesso.

Inattivazione

La normativa italiana non fornisce indicazioni sulla definizione di “inattivazione”.

Si riportano nella Tabella. 20 le definizioni proposte dal Regolamento sulla gestione dei rifiuti sanitari, DPR 15 luglio 2003, pur se non applicabile ai MOGM, confrontate con quelle riportate nelle norme UNI EN 12461: 2000 e UNI EN 12470: 2002, dalla norma UNI 10834/1 e da altri riferimenti internazionali autorevoli quali le linee guida dell’ US National Institutes of Health

“NIH guidelines for research involving recombinant DNA molecole” (ultima revisione aprile 2002), Appendice K e la 5° edizione di “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)”, Appendice B dell’US Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention con il National Institutes of Health.

Per quanto riguarda le procedure di decontaminazione, lavaggio, confezionamento e sterilizzazione si può fare riferimento alle “Linee Guida sull’attività di sterilizzazione quale protezione collettiva da agenti biologici per l’operatore nelle strutture sanitarie” pubblicate sul sito ISPESL in area “Documentazione” (indirizzo http://www.ispesl.it/linee_guida/fattore_di_rischio/LGAgeBioSter.asp) avendo cura di verificare le compatibilità delle indicazioni ivi riportate con la normativa specifica sui rifiuti. Ad esempio, nel caso di laboratori, stabulari, serre e camere di crescita e di livelli di contenimento fino a 3, in cui l’autoclave può essere situata al di fuori della struttura confinata e probabilmente al servizio anche di altre unità, è utile conoscere anche le disposizioni del DPR 215/2003, ovvero della norma UNI 10384/94.

TABELLA. 20 Definizioni collegate all’inattivazione (vari gradi di decontaminazione)

TERMINE	DPR 15/7/2003	UNI EN 12461:2000	UNI EN 12470:2001	NIH guidelines (4/2002)	DHHS CDC – NIH BMBL (2/2007)
Inattivazione		processo usato per raggiungere uno stato libero da microrganismi di processo vitali	distruzione parziale o completa di una data attività fino alla distruzione del sistema microbiologico	qualsiasi processo che distrugge la capacità di uno specifico agente microbiologico o cellula eucariotica di auto-replicarsi	
Decontaminazione			rimozione o riduzione a livelli accettabili della contaminazione microbiologica		rende un’area, un dispositivo, un articolo o un materiale sicuro da manipolare, riducendo il livello di contaminazione microbica in modo da eliminare la trasmissione delle infezioni.
Disinfezione	drastica riduzione della carica microbica effettuata con l’impiego di sostanze disinfettanti	processo atto a ridurre il numero di microrganismi vitali mediante vari metodi fisici e chimici	processo di riduzione del numero di microrganismi vitali mediante vari metodi fisici e chimici	processo attraverso cui agenti microbiologici trasmissibili o cellule eucariotiche sono ridotti ad un livello tale da rendere improbabile l’induzione di malattie in uomini sani, animali o piante	processo meno letale della sterilizzazione che elimina quasi tutti i microrganismi riconosciuti come patogeni, ma non necessariamente tutte le forme microbiche (ad es. spore batteriche) presenti su oggetti inanimati
Disinfettante		agente chimico in grado di ridurre il numero dei microrganismi vitali			
Sterilizzazione	abbattimento della carica microbica tale da garantire un SAL (Sterility Assurance Level) (*) non inferiore (+) a 10 ⁻⁶ (§)	processo adottato per ottenere lo stato sterile	processo usato per ottenere lo stato sterile		processo per uccidere tutti i microrganismi, incluso un elevato numero di endospore batteriche, non così categoricamente definibile da un punto di vista operativo se non come un processo a seguito del quale la probabilità che un microrganismo sia sopravvissuto su un oggetto sottoposto al trattamento è inferiore ad 1 su 1 milione (10 ⁻⁶) (definizione di SAL*)
Sterile		stato di assenza di microrganismi vitali (1) e (2)	libero da microrganismi vitali (1) e (2)		esente da qualsiasi microrganismo vivente o virus. La definizione è categorica e assoluta

TERMINE	DPR 15/7/2003	UNI EN 12461:2000	UNI EN 12470:2001	NIH guidelines	
Sterilizzatrici	apparecchiature dedicate esclusivamente alla sterilizzazione dei rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo (ç)				
Validazione / convalida		procedimento documentato per ottenere registrare ed interpretare i risultati necessari per dimostrare che un processo ottiene costantemente un prodotto conforme a una specifica predeterminate	procedura documentata per ottenere registrare ed interpretare i risultati necessari per dimostrare che un processo fornisce costantemente un prodotto conforme a specifiche predeterminate	dimostrazione dell'efficacia di una procedura sull'organismo che funge da ospite per la propagazione della molecola di DNA ricombinante	

(*) probabilità che un microrganismo sia sopravvissuto sul materiale sottoposto al trattamento.

(+) si ritiene si tratti di un errore; in realtà al posto di "inferiore" dovrebbe essere scritto "superiore".

(§) La sterilizzazione è effettuata secondo le norme UNI 10384/94, parte prima, mediante procedimento che comprenda anche la triturazione e l'essiccamento ai fini della non riconoscibilità e maggiore efficacia del trattamento, nonché della diminuzione di volume e di peso dei rifiuti stessi. Possono essere sterilizzati unicamente i rifiuti sanitari pericolosi a solo rischio infettivo. L'efficacia viene verificata secondo quanto indicato nell'Allegato III dello stesso DPR. La sterilizzazione dei rifiuti sanitari a rischio infettivo è una facoltà esercitabile ai fini della semplificazione delle modalità di gestione dei rifiuti stessi.

(ç) L'efficacia del procedimento di sterilizzazione ed i metodi per dimostrarla, sono stabiliti dalla norma UNI 10384/94, parte prima, sulla base delle prove di convalida in essa stabilite.

(1) *Nota 1 In pratica una tale affermazione assoluta riguardante l'assenza di microrganismi vitali non può essere provata. Tuttavia le condizioni di sterilità si possono considerare raggiunte qualora si utilizzi un metodi di sterilizzazione accettato o riconosciuto.*

(2) *Nota 2 Il processo di inattivazione di microrganismi vitali durante la procedura di sterilizzazione è solitamente descritto da una funzione matematica empirica, comunemente una funzione esponenziale. Per la loro natura matematica, tali funzioni possono essere ridotte a numeri molto bassi ma non a zero. Comunque, tali funzioni empiriche possono essere valide per controllare o stabilire i parametri nella procedura di sterilizzazione per ottenere il grado voluto di inattivazione dei microrganismi vitali.*

Disinfezione

La disinfezione non assicura un "overkill" e quindi è carente nel garantire i margini di sicurezza raggiungibili con la sterilizzazione. L'efficacia di una procedura di disinfezione è controllata significativamente da un numero di fattori ciascuno dei quali può avere un effetto pronunciato sul risultato finale.

I fattori che influenzano la disinfezione dipendono:

1. caratteristiche del prodotto
 - spettro di attività microbica
 - tipo di attività
2. popolazione microbica
 - carica microbica
 - specie microbica e fase del ciclo vitale
 - variazione della resistenza microbica
3. condizioni di impiego
 - concentrazione d'uso
 - tempo di azione
 - temperatura e pH
 - caratteristica del solvente
 - accessibilità dei batteri
 - inattivazione del disinfettante
4. la quantità di sostanza organica presente (ad es. terra, feci e sangue);
5. il tipo e le condizioni di strumenti, dispositivi e materiali da disinfettare.

La disinfezione è una procedura che riduce il livello di contaminazione microbica, in base al livello di attività del disinfettante utilizzato. Per definizione la disinfezione chimica ed in particolare la disinfezione di alto livello, differisce dalla sterilizzazione chimica per la sua assenza di potere sporicida. Anche se alcuni disinfettanti a concentrazioni elevate e dopo diverse ore di esposizione possono ridurre il numero delle spore.

Generalmente si distinguono tre livelli di disinfezione. La disinfezione di livello basso utilizza disinfettanti in grado di eliminare la maggior parte dei batteri, alcuni funghi e virus, ma non i microrganismi resistenti come il *Mycobacterium tuberculosis* e le spore. Con la disinfezione di livello intermedio sono inattivati tutti i batteri in forma vegetativa (compreso *M. tuberculosis*), la maggior parte dei virus e dei funghi, ma non necessariamente le spore. Nella disinfezione di elevato livello si ottiene la distruzione di tutti i microrganismi ad eccezione di un certo numero di spore batteriche. La principale eccezione alle regole dell'inattivazione microbica e della decontaminazione è il prione del morbo di Creutzfeldt-Jakob o altri prioni responsabili delle encefalopatie spongiformi trasmissibili del sistema nervoso centrale di esseri umani o animali. Gli studi effettuati mo-

strano che i prioni sono resistenti alle prassi convenzionali di sterilizzazione chimica e/o termica. Una panoramica sulle proprietà dei principali disinfettanti è riportata in Tabella. 21.

TABELLA. 21 – PROPRIETÀ DEI PRINCIPALI DISINFETTANTI (*)

Tipo di disinfettante	Attivo contro *)							Interferenza negativa da			Attività, livelli concentrazione e tempo d'azione	Aspetti positivi	Aspetti negativi
	Funghi	Batteri		Microbatteri	Spore	Virus lipidici	Virus non lipidici	Proteine	Acqua dura	Detergenti			
		Gram-positivi	Gram-negativi										
Composti fenolici	XXX	XXX	XXX	XX	-	X	v	+	+	C	intermedia 0,4-3%, rapido	biodegradabili e scarsamente volatili (fenoli sintetici)	maleolenti, irritanti, tossici, inattivabili da materiale organico
Ipocloriti	X	XXX	XXX	XX	XX	X	X	+++	+	C	intermedia 0,5%, rapido	basso costo, fortemente attivi contro l'epatite virale, deodoranti	altamente instabili, corrosivi per i metalli, inattivabili da materiale organico, irritanti e lesivi
Alcoli	-	XXX	XXX	XXX	-	X	v	+	+	-	intermedia 70%, rapido		rapida evaporazione (riduzione tempi contatto), incapacità di penetrare il materiale organico residuo
Formaldeide	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX ^a	X	X	+	+	-	alta, 6-8%, non determinato		cancerogena (sconsigliata dal Ministero della Sanità con Circolare n.57/83)
Glutaraldeide	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX ^b	X	X	+	+	-	alta - intermedia, variabile (2%) - da 30' a 3h		tossica
Iodofori	XXX	XXX	XXX	XXX	X ^c	X	X	+++	+	A	intermedia		irritanti, si inattivano a T>43°C
XXX: buono XX: adeguato X: leggero -: nullo *) se i dati del fabbricante sono rispettati							v: dipendente dal virus a: >40°C b: >20°C c: su tempi di esposizione lunghi		+++: molto ++: parzialmente +: debolmente -: nullo		C: cationico A: anionico		

Nota – Si richiama l'attenzione su tossicità e/o allergenicità dei disinfettanti e sul loro impatto ambientale

(*) fonti: Norma UNI EN 12461:2000 – US Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention & National Institutes of Health “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)”, 5th edition, Appendix B - AMA (L.D'Amico, M.Mariani, E.Bemporad) - ANMDO (AA.VV.): “I rifiuti sanitari - Normativa e modalità di gestione” Febbraio 1997

La resistenza alla decontaminazione di alcuni organismi saggiati è illustrata nel diagramma a piramide di Figura. 13.

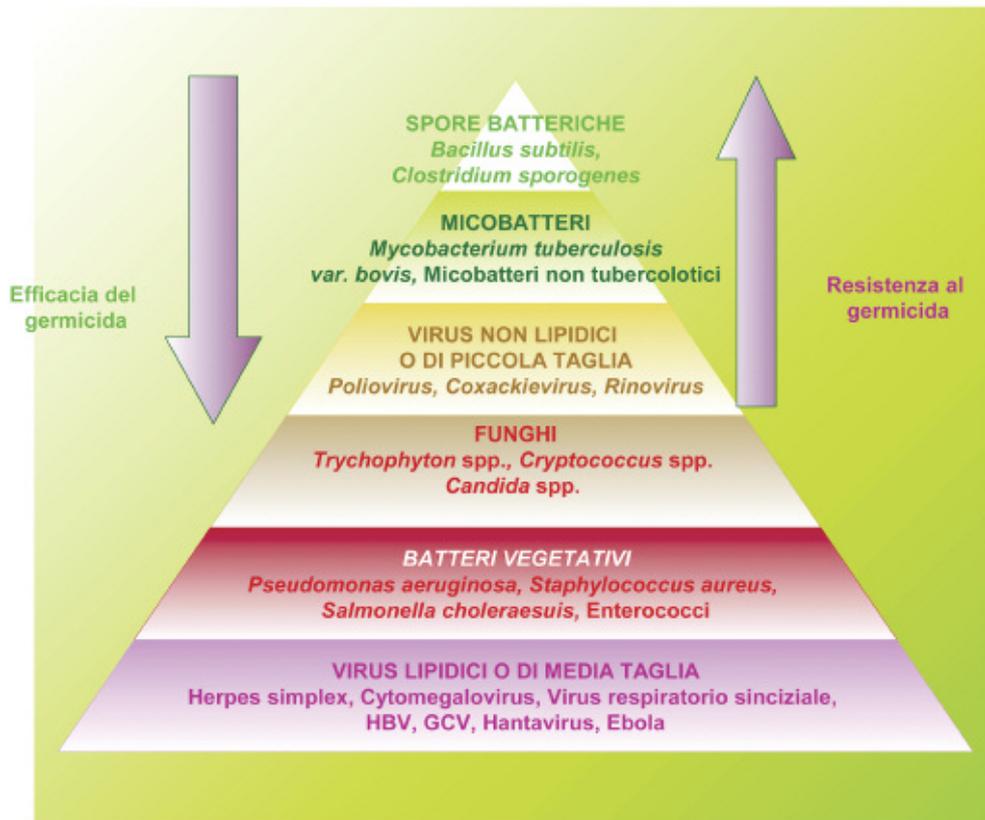


Figura. 13 - Ordine discendente di resistenza ai germicidi chimici

Note: ci sono eccezioni alla lista. Gli *Pseudomonas spp* sensibili ai disinfettanti, se formano biofilm le cellule protette possono approssimare la loro resistenza a quella delle spore batteriche.

Sterilizzazione

Si riportano in sintesi le disposizioni della norma UNI 10384/94, cui fa riferimento il DPR 215/2003.

La norma prevede innanzi tutto la classificazione dei rifiuti, per cui si individua la necessità della sterilizzazione in base alle disposizioni di legge, in funzione delle caratteristiche merceologiche dei materiali che li compongono e dei reparti di provenienza secondo un codice alfanumerico contenuto in 2 stringhe di cui la prima contiene informazioni sul rifiuto e la seconda sull'ente.

La norma prevede poi che i rifiuti siano raccolti in sistemi di contenimento con dimensioni nominali e requisiti stabiliti contrattualmente, che non compromettano efficacia, funzionalità e sicurezza del processo di sterilizzazione e siano marcati e/o corredati con informazioni specifiche di carattere sia amministrativo che tecnico.

Nel caso venga utilizzato un dispositivo di caricamento questo non deve creare interferenze tra la bocca di carico ed i contenitori né danneggiare quest'ultimi, né creare impedimenti alla sterilizzazione. Eventuali pretrattamenti dei rifiuti devono avvenire in una struttura in depressione fisicamente collegata a tenuta alla sterilizzatrice.

Il ciclo di sterilizzazione deve essere automatico e prevedere un sistema di controllo in continuo della variabile di processo (definita come grandezza fisica, o combinazione di grandezze fisiche, da controllare durante il ciclo ai fini del raggiungimento della sterilità), ed essere in grado di segnalare automaticamente eventuali deviazioni di quest'ultima oltre i limiti stabiliti. Le condizioni stabilite devono essere raggiunte nel punto critico ed uniformemente nella camera e nel carico, mantenute per il tempo prefissato e riproducibili. Eventuali effluenti devono essere trattati.

Prima dell'esercizio regolare il processo di sterilizzazione deve essere convalidato dal punto di vista fisico e biologico per dimostrare il raggiungimento delle condizioni nel punto critico ed il loro mantenimento entro i limiti prefissati per il tempo stabilito, e un adeguato margine di sicurezza e di riproducibilità. Vengono quindi indicati i criteri per stabilire le condizioni di sterilizzazione e le documentazioni e registrazioni da effettuare. Inoltre è prevista l'approvazione del verbale di convalida da parte di personale estraneo al processo.

Per la sterilizzatrice la norma fornisce inoltre:

- i requisiti costruttivi in relazione al materiale, al recipiente a pressione, alla temperatura delle superfici esterne, ai sistemi di chiusura o confinamento e relativi dispositivi di sicurezza, ai raccordi per l'effettuazione delle prove, al telaio e alle pannellature;
- la strumentazione di cui deve essere fornita ed in particolare gli strumenti di controllo, i dispositivi di segnalazione, i

- sensori, il sistema di temporizzazione e le registrazioni automatiche;
- il sistema di controllo automatico con individuazione di ciclo abortito;
- le prove di tipo e funzionali, sia biologiche che fisiche secondo un programma specificato;
- la marcatura da apporre;
- la documentazione di cui deve essere corredata.

Viene poi descritto l'apparato di prova: contenitore, carico, strumenti e indicatori biologici.

Sono fornite indicazioni per il collaudo di conformità, la messa in servizio e la convalida sia iniziali che successive, quindi sulla verifica delle caratteristiche funzionali e sulla manutenzione. La messa in servizio in particolare prevede una verifica sulla precisione degli strumenti, parametri fisici registrati ed indicati, aumento di pressione in caso di rimozione dell'aria per mezzo del vuoto, assenza di perdite di fluidi, rispondenza delle emissioni alla normativa, alimentazione di fluidi ed energia elettrica e livello di pressione sonora.

Sono infine fornite alcune indicazioni per la formazione del personale ed in particolare il responsabile, gli operatori, il collaudatore ed i manutentori.

Trattamento e destino del rifiuto

Qualora il rifiuto debba essere inviato a termovalorizzazione (ad esempio perché inserito nel circuito dei rifiuti pericolosi a rischio infettivo) non dovrebbe in ogni caso essere sottoposto a disinfezione in quanto i disinfettanti potrebbero generare problemi di carico emissivo presso gli impianti, bensì sarebbe opportuno che fosse sottoposto a sterilizzazione.

Non bisogna dimenticare poi che l'infettività e la mutagenicità indotta da microrganismi sono le uniche caratteristiche di pericolo verso le quali l'inattivazione può essere efficace.

È opportuno inoltre ricordare due fattori fondamentali ai fini della corretta individuazione del destino finale del rifiuto:

- il rifiuto, pur se inattivato, continua a conservare altre caratteristiche di pericolo in funzione della sua natura e della sua origine ed è molto importante tenerne conto ai fini della sicurezza degli operatori, in tutte le fasi di gestione del rifiuto;
- l'articolo 6 del decreto legislativo n.36/2003 stabilisce che non possono essere ammessi in discarica rifiuti che rientrano nella categoria 14 dell'Allegato G1 al D. Lgs n. 22/1997, ora abrogato e sostituito dalla parte IV del D. Lgs n.152/2006, ovvero "sostanze chimiche non identificate e/o nuove provenienti da attività di ricerca, di sviluppo o di insegnamento, i cui effetti sull'uomo e/o sull'ambiente non sono noti (es. rifiuti di laboratorio)".

Quindi il rifiuto, sulla base del rischio residuo a seguito dell'inattivazione, può essere consegnato ad una ditta specializzata. Considerando la gerarchia dei rischi (vedi anche Appendice X sull'ADR), secondo cui il rischio radioattività è predominante rispetto agli altri, può essere utile fornire qualche indicazione sulle corrette modalità di gestione dei rifiuti radioattivi già definiti nel paragrafo relativo alla classificazione, sulla base della normativa speciale che li disciplina (decreto legislativo n.230/1995, come modificato ed integrato dal decreto legislativo n.241/2000).

Cenni sulla gestione dei rifiuti radioattivi

I rifiuti radioattivi sono classificati in base alla loro attività e al loro tempo di dimezzamento. Allo stato attuale non esiste una classificazione armonizzata a livello europeo. L'IAEA classifica i rifiuti radioattivi nel seguente modo:

- rifiuti a bassa attività (LLW, Low Level Waste): il loro livello di radioattività è al di sopra dei limiti che permetterebbero loro di essere smaltiti come rifiuti convenzionali;
- rifiuti ad attività intermedia (ILW, Intermediate Level Waste): il loro livello di radioattività supera il limite stabilito per le scorie di basso livello. Essi richiedono la schermatura nelle manipolazioni o un adeguato contenitore di stoccaggio. Per questi rifiuti non è necessario prendere in considerazione il calore di decadimento nella progettazione delle strutture di contenimento e di smaltimento;
- rifiuti ad alta attività (HLW, High Level Waste): il loro elevato livello di radioattività richiede protezione del personale, schermatura, remotizzazione delle operazioni e considerazione degli effetti termici, dovuti alla interazione delle radiazioni con la materia, nella progettazione delle strutture di stoccaggio e di smaltimento. Rifiuti di questo tipo sono i prodotti derivanti dal riprocessamento di combustibile nucleare irraggiato o gli stessi elementi di combustibile irraggiato.

In Italia, la classificazione dei rifiuti è contenuta nella Guida Tecnica n. 26 emanata dall'ENEA-DISP ora APAT (Agenzia Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici). Secondo tale documento i rifiuti sono classificati in tre categorie ciascuna delle quali prevede una diversa modalità di gestione e di smaltimento:

Prima categoria: vi appartengono i rifiuti radioattivi che richiedono tempi di decadimento dell'ordine di mesi, sino ad un tempo massimo di alcuni anni, per decadere a concentrazioni di radioattività di rilevanza trascurabile (dell'ordine delle centinaia di Bq/g) e quelli contenenti radionuclidi a lungo periodo di dimezzamento purché in concentrazioni non rilevanti; *hanno origine essenzialmente dagli impieghi medici e di ricerca scientifica*, dove i radionuclidi utilizzati (tranne alcuni casi specifici quali quelli del ^3H e del ^{14}C) sono caratterizzati da tempi di dimezzamento relativamente brevi (inferiori a 1 anno) e, nella maggior parte dei casi, inferiori ai 2 mesi.

Seconda categoria: vi appartengono i rifiuti che richiedono tempi di decadimento variabili da qualche decina fino ad alcune centinaia di anni per raggiungere concentrazioni di radioattività dell'ordine di alcune centinaia di Bq/g, nonché quei rifiuti

contenenti radionuclidi a vita molto lunga purché in concentrazioni di tale ordine. Sono previste 2 sottocategorie:

- rifiuti solidi la cui attività è al di sotto dei limiti stabiliti che possono essere smaltiti senza ulteriori trattamenti;
- rifiuti la cui attività è superiore ai limiti stabiliti e che devono essere condizionati al fine di raggiungere determinati requisiti meccanici, chimici e fisici per poter essere smaltiti sulla terraferma;

in questa categoria rientrano in gran parte i rifiuti provenienti da particolari cicli di produzione degli impianti nucleari e soprattutto dalle centrali elettronucleari di potenza *nonché da alcuni particolari impieghi medici, industriali e di ricerca scientifica*. Vi rientrano, inoltre, anche alcune parti e componenti di impianto derivanti dalle operazioni di “decommissioning” degli impianti nucleari.

Terza categoria: vi appartengono tutti i rifiuti che non sono riconducibili alle due categorie precedenti. In particolare i rifiuti radioattivi di detta categoria richiedono tempi di decadimento dell’ordine di migliaia di anni ed oltre ed oltre per raggiungere concentrazioni di radioattività dell’ordine di alcune centinaia di Bq/g; in tale categoria rientrano in particolare:

- i rifiuti liquidi ad elevata attività specifica derivanti dal primo ciclo di estrazione degli impianti di riprocessamento (o liquidi equivalenti) ed i solidi in cui questi liquidi possono essere convertiti;
- i rifiuti contenenti emettitori di alfa e neutroni provenienti essenzialmente dai *laboratori di ricerca scientifica, da usi medici ed industriali*, dagli impianti di fabbricazione degli elementi di combustibile ad ossido misto e dagli impianti di riprocessamento.

Nella successiva Tabella. 22 viene riportato il confronto fra le categorie della Guida Tecnica n. 26 e la classificazione IAEA.

CATEGORIE	CARATTERISTICHE	Confronto con GT26	Tipo di gestione suggerito
VLLW	Rifiuti che decadono in pochi mesi (massimo alcuni anni) a livelli inferiori ai limiti stabiliti per il rilascio incondizionato	I	Stoccaggio temporaneo e smaltimento come rifiuti convenzionali
LILW-SL	Rifiuti a bassa e media attività con limitato contenuto di α radionuclidi α emittenti	II	Condizionamento e smaltimento in un sito ingegneristico in superficie
LILW-LL	Rifiuti a bassa e media attività che eccedono il limite di 4000 Bq/g per α emittenti	III	Condizionamento in matrice cementizia e smaltimento di depositi di media profondità (>100 m)*
HL W	Rifiuti che eccedono il limite di 4000 Bq/g per α emittenti e presentano una significativa produzione di calore (>100 W/m ³)	III	Condizionamento in matrice vetrosa e smaltimento in formazione geologica profonda (100-800 m) dopo un periodo di stoccaggio di 30-50 anni in adeguate strutture ingegneristiche (2)

Tabella. 22

Legenda: VLLW – Very Low Level Waste
 LILW-SL – Low and Intermediate Level Waste – Short Lived
 LILW-LL – Low and Intermediate Level Waste – Long Lived
 HLW – High Level Waste

Occorre inoltre precisare che anche quando i rifiuti risultino al di sotto della soglia di radioattività come definita nel paragrafo sulla classificazione, per cui possono essere smaltiti come rifiuti speciali, è comunque prevista una valutazione della esposizione e della dose efficace individuale e collettiva prima dello smaltimento definitivo nel rispetto dei seguenti criteri:

- dose efficace individuale $\leq 10 \mu\text{Sv/anno}$;
- dose efficace collettiva $\leq 1 \mu\text{Sv} \times \text{persona/anno}$.

Se sono presenti radionuclidi con tempi di dimezzamento diversi sarebbe opportuno raccogliergli in modo differenziato e, nel caso in cui ciò non fosse possibile, indicare sul contenitore il radionuclide con tempo di decadimento maggiore. I contenitori devono garantire il contenimento, preferibilmente doppio al fine di evitare contaminazioni esterne. I livelli di irraggiamento esterno e di contaminazione superficiale dei contenitori devono essere conformi alla classificazione dei locali e dei lavoratori effettuata dall’“esperto qualificato” ai sensi del d.lgs. n.230/95 e s.m.i.

OBBLIGHI AMMINISTRATIVI

Dato il notevole coacervo di disposizioni normative che regolano le attività di gestione dei rifiuti all'interno ed all'esterno dei luoghi di produzione, si riportano schematicamente nella Tabella. 23 i principali obblighi relativi a tutte le attività coinvolte, dalla produzione allo smaltimento finale (l'obbligo si applica nei casi segnalati in grigio).

Attività	Registro carico e scarico - Progressivamente entro 2010 SISTRI*	Formulario identificazione (FIR) - progressivamente entro 2010 SISTRI*	Iscrizione Albo	Autorizzazione Regionale (o Provinciale)	Denuncia annuale Catasto (MUD) - progressivamente entro 2010 SISTRI*
Produzione (iniziale)	(1,2) **				(1,3)
Detenzione					
Deposito temporaneo				(4)	
Commercio ed intermediazione (senza detenzione), raccolta e trasporto		(controfirma per FIR)***	(6,7)		(5)
Stoccaggio (8), smaltimento**** e recupero (9)		(controfirma per FIR)	(7)		

Tabella. 23

* Sistema di controllo della tracciabilità dei rifiuti istituito con i DM Ambiente 17/12/2009 e 15/02/2010 – entrata in vigore 14/1/2010 (primo termine iscrizione per alcune categorie entro 75 gg.) L'iscrizione è necessaria per essere abilitati ad accedere al SISTRI. I soggetti obbligati (ma è prevista anche un'adesione volontaria) dovranno comunicare quantità e caratteristiche dei rifiuti oggetto della loro attività attraverso il SISTRI, utilizzando dei dispositivi elettronici tipo chiavette USB collegati ad un centro raccolta dati.

La responsabilità del produttore dei rifiuti per il corretto recupero o smaltimento degli stessi è esclusa in caso di conferimento di rifiuti al servizio pubblico di raccolta o a seguito dell'invio da parte del SISTRI, alla casella di posta elettronica attribuitagli automaticamente dal sistema, della comunicazione di accettazione dei rifiuti medesimi da parte dell'impianto di recupero o smaltimento.

- 1) soltanto per rifiuti pericolosi e rifiuti non pericolosi derivanti da lavorazioni industriali e artigianali ed i rifiuti derivanti dalla attività di recupero e smaltimento di rifiuti, i fanghi prodotti dalla potabilizzazione e da altri trattamenti delle acque e dalla depurazione delle acque reflue e da abbattimento di fumi (di cui all'art. 184, c. 3, lettere c), d) e g) del D. Lgs 152/2006 parte IV
- 2) i soggetti la cui produzione annua di rifiuti non eccede le 10 tonnellate di rifiuti non pericolosi (vedi nota 1) e le 2 tonnellate di rifiuti pericolosi possono adempiere all'obbligo di tenuta dei registri di carico e scarico anche tramite le organizzazioni di categoria interessate o loro società di servizi

** Appena prodotto un rifiuto, i produttori dovranno inserire nell'Area Registro Cronologico della Scheda SISTRI PRODUTTORI le informazioni relative ad essi prodotti entro dieci giorni lavorativi dalla produzione degli stessi.

*** In caso di movimentazione di un rifiuto, i soggetti indicati dovranno accedere al sistema per aprire una nuova Scheda SISTRI – AREA MOVIMENTAZIONE. Tali soggetti sono obbligati a comunicare al sistema i dati del rifiuto almeno 8 ore prima che si effettui l'operazione di movimentazione, salvo giustificati motivi di emergenza. Durante il trasporto i rifiuti devono essere accompagnati dalla copia cartacea della Scheda SISTRI – AREA MOVIMENTAZIONE relativa ai rifiuti stampata dal produttore dei rifiuti al momento della presa in carico dei rifiuti da parte del conducente dell'impresa di trasporto. Tale copia, sottoscritta dal produttore e dal trasportatore dei rifiuti, costituisce documentazione equipollente al FIR.

- 3) ad eccezione degli imprenditori agricoli con un volume di affari annuo non superiore a 8.000 €, delle imprese che raccolgono e trasportano i propri rifiuti non pericolosi, nonché, per i soli rifiuti non pericolosi, delle imprese e gli enti produttori iniziali che non hanno più di 10 dipendenti
- 4) soltanto se non rispetta le condizioni previste dall'art.183, c. 1, lett. m) del D. Lgs 152/2006 parte IV
- 5) soltanto se effettuate a titolo professionale, ovvero conto terzi
- 6) per i rifiuti sottoposti a procedure semplificate ai sensi dell'art. 216, del D. Lgs 152/2006 parte IV ed effettivamente

avviati al riciclaggio ed al recupero è sufficiente una semplice comunicazione di inizio attività alla Sezione Regionale (o Provinciale) territorialmente competente

- 7) i Consorzi obbligatori, sono esclusi dall'obbligo d'iscrizione all'Albo
- 8) lo stoccaggio secondo la definizione dell'art. 183, c.1, lettera l), del D. Lgs 152/2006 parte IV, distinto dal deposito temporaneo, ovvero esterno al luogo di produzione (operazione di recupero R13 o di smaltimento D15 appositamente autorizzata)
- 9) la sterilizzazione è soggetta agli obblighi amministrativi segnalati solo se effettuata all'esterno del perimetro della struttura di produzione; gli obblighi di comunicazione dell'attivazione, di convalida dell'impianto, di verifica e certificazione del processo e di controllo periodico da parte delle Autorità competenti sono prescritti dall'art.7 del DPR n.254/2003 da cui però sono esclusi i MOGM

**** Gli impianti di discarica e gli impianti di incenerimento dei rifiuti dovranno essere dotati di apparecchiature idonee a monitorare l'ingresso e l'uscita di automezzi, la cui installazione, manutenzione e accesso sono riservati al personale del SISTRI, con oneri a carico dello stesso.

Appendice X I MOGM secondo l'ADR (2009)

L'ADR definisce i Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM) e gli Organismi Geneticamente Modificati (OGM) "microrganismi e organismi nei quali il materiale genetico è stato di proposito modificato mediante un procedimento che non si riscontra in natura"; se contengono agenti patogeni, definiti come microrganismi (compresi batteri, virus, rickettsie, parassiti, funghi) e altri agenti come i prioni, che possono causare malattie all'uomo o agli animali, vengano assegnati alla classe 6.2 "Materie infettanti", così suddivise:

11. Materie infettanti per l'uomo
12. Materie infettanti unicamente per gli animali
13. Rifiuti ospedalieri
14. Materia biologica

Le materie infettanti sono poi suddivise in:

- categoria A, ovvero trasportata in una forma che può, quando si verifichi un'esposizione, causare un'invalidità permanente o una malattia letale o potenzialmente letale alle persone o agli animali, fino ad allora in buona salute
- categoria B se non soddisfa i criteri per la categoria A

Se invece i materiali non rispondono alla definizione di materie infettanti, ma possono causare agli animali, ai vegetali o alle materie microbiologiche modifiche che, normalmente, non risultano dalla naturale riproduzione, sono assegnati alla classe 9 "Materie ed oggetti pericolosi diversi" (N° ONU 3245).

Il titolo della classe 9 prevede 11 tipologie di cui la M8, tra quelle relative a sostanze pericolose per l'ambiente, è riservata ai microrganismi e organismi geneticamente modificati.

I MOGM e gli OGM non sono sottoposti alle disposizioni dell'ADR quando le autorità competenti dello Stato di origine, di transito e di destinazione ne autorizzano l'utilizzazione (autorizzazione di disseminazione volontaria nell'ambiente). Essi devono essere trasportati conformemente alle condizioni specificate dall'autorità competente del paese di origine. Se invece rientrano nella definizione di sostanze infettanti e nei criteri per l'inclusione nella Classe 6.2 devono essere trasportati come UN 2814, 2900 o 3373.

Relativamente alla caratteristica infettante l'ADR fornisce un ordine di precedenza per la classificazione della materia, soluzione o miscela, nella classe o gruppo di materie corrispondente al pericolo preponderante. La lista di priorità dei rischi è la seguente e si evidenzia che le materie infettanti della classe 6.2 sono all'ultimo posto:

1. Materiale di Classe 7 (radioattive, eccetto i materiali in imballaggi esentati per cui le altre caratteristiche di pericolo hanno la precedenza);
2. Sostanze di Classe 1 (esplosive);
3. Sostanze di Classe 2 (gas);
4. Liquidi esplosivi desensibilizzati di Classe 3 (infiammabili);
5. Sostanze auto-reattive e solidi esplosivi desensibilizzati di Classe 4.1;
6. Sostanze piroforiche di classe 4.2 (a rischio di combustione spontanea);
7. Sostanze di Classe 5.2 (perossidi organici);
8. Sostanze di Classe 6.1 (tossiche) o 3 (infiammabili) che, sulla base della loro tossicità per inalazione, devono essere classificate nel Gruppo d'Imballaggio 1 (alto rischio) (Sostanze che soddisfano i criteri di classificazione della Classe 8 e presentano una tossicità per inalazione di polveri e nebbie (LC₅₀) nell'intervallo del Gruppo d'Imballaggio 1 ed una tossicità per ingestione orale e contatto dermico soltanto nell'intervallo del Gruppo d'Imballaggio 3 (basso rischio) o inferiore, devono essere collocate in Classe 8);
9. Sostanze infettanti di Classe 6.2

Per quanto riguarda invece la Classe 9 la tabella di precedenza dei rischi non la pone mai come prioritaria, per cui vanno seguite le indicazioni relative ad imballaggio e trasporto relative agli altri rischi.

Quanto già indicato nel testo relativamente all'imballaggio risulta in accordo con le disposizioni dell'ADR.

Principali attrezzature di laboratorio

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.

Le attrezzature vanno scelte a seconda di alcuni principi generali per i quali devono essere:

1. progettate per impedire e/o limitare il contatto tra l'operatore e il materiale infetto;
2. fabbricate con materiali impermeabili ai liquidi, resistenti alla corrosione e rispondenti a requisiti di resistenza strutturale;
3. prive di spigoli vivi, parti sporgenti o taglienti e parti mobili non bloccabili;
4. progettate, costruite ed installate per consentire un impiego agevole, facilità di manutenzione, pulizia, decontaminazione e controlli di qualità ed idoneità. Va evitato per quanto possibile l'uso di materiali in vetro o infrangibili.

A seconda del livello di contenimento stabilito per le operazioni da effettuare saranno necessarie oltre che attrezzature di diverso tipo, anche accessori supplementari.

Ogni apparecchiatura deve essere corredata di apposita scheda dove registrare le informazioni utili su:

- provenienza;
- acquisto;
- installazione;
- collaudo;
- date di ricevimento e messa in funzione;
- riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione, quando necessari, loro periodicità;
- dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

La strumentazione in dotazione ad un laboratorio deve soddisfare le caratteristiche di affidabilità di funzionamento, di sicurezza, di precisione ed accuratezza del risultato al fine di garantire la sicurezza dell'operatore e non alterare l'esito finale del lavoro realizzato.

A tale scopo è necessario che le apparecchiature vengano tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano un'adeguata protezione dal deterioramento.

L'efficienza dovrà essere garantita attraverso un insieme di adeguate procedure di manutenzione (ordinaria, straordinaria, programmata) e di taratura.

Manutenzione ordinaria

Deve essere realizzata dall'operatore al momento dell'uso per garantire il buon funzionamento dell'apparecchiatura.

Manutenzione straordinaria

Si tratta di un intervento realizzato a seguito di guasti o anomalie di funzionamento. Sono interventi effettuati su specifica richiesta e di norma vengono eseguiti da un tecnico specializzato della ditta fornitrice.

Manutenzione programmata

Viene effettuata con cadenze temporali prefissate per evitare decadimenti nel buon funzionamento dell'apparecchiatura. Di norma gli interventi vengono eseguiti dalla ditta fornitrice con la quale si stipula un contratto di manutenzione annuale.

Taratura

Questa operazione è necessaria a garantire che l'apparecchio e lo strumento utilizzato sia in grado di fornire misure entro i limiti di tolleranza previsti dai requisiti tecnici.

Nell'ambito dei controlli operativi è opportuno stabilire:

- le modalità di taratura e manutenzione,
- le loro frequenze,
- il personale responsabile delle verifiche.

Le operazioni di manutenzione e taratura devono essere riportate in schede riassuntive:

Scheda di manutenzione che riporti la data e la firma del tecnico che ha effettuato le operazioni relative a:

- verifica,
- sostituzioni,

- pulizia.

Scheda di taratura su cui viene riportato:

- procedura di taratura,
- programma di taratura,
- data di svolgimento della stessa e di quella futura
- firma del tecnico
- riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo.

Se la taratura viene attuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Un'apparecchiatura che, in seguito a taratura, non sia risultata idonea al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio e contrassegnata da un'etichetta visibile che riporti la data di rilevazione dell'evento. L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a quando la riparazione o l'ulteriore taratura non la rendano di nuovo funzionante. L'evento dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Disinfezione della strumentazione

- applicazione di procedure e protocolli indicati dalla casa produttrice;
- semplice disinfezione dopo ogni utilizzo;
- esecuzione periodica di cicli di disinfezione e lavaggio (notificato su apposito registro);
- manutenzione ordinaria e straordinaria da parte del personale specializzato (notificate su apposito registro).

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.

Tali cappe, al momento dell'installazione, devono essere conformi alla norma UNI EN 12469, marcatura CE e alla dichiarazione di conformità. La EN 12469 è organizzata in 8 capitoli e alcuni allegati. Molti di questi allegati sono considerati "normativi", altri "informativi". I requisiti minimi di performance sono riportati nella Tabella. 24 delle EN 12469 e sono considerati normativi, mentre i valori di velocità dell'aria riportati nella tabella H1 della EN 12469 sono considerati informativi. Le cappe sono classificate in tre categorie (Classe I, Classe II, Classe III) a seconda del livello di protezione che garantiscono all'operatore, all'ambiente circostante e al prodotto.

Utilizzo	Tipo di protezione	Cappa biologica di sicurezza
Impieghi confinati a basso rischio	Protezione operatore e ambiente	Classe I (0% aria ricircolata – 100% aria espulsa)
Impieghi confinati a basso rischio o moderato, piccole quantità di agenti chimici tossici, radionuclidi in tracce	Protezione operatore ambiente e prodotto	Classe II A1 e A2 (70% aria ricircolata – 30% aria espulsa)
Quantità maggiori di agenti chimici tossici volatili o radioattivi	Protezione operatore ambiente e prodotto	Classe II B1 (30% aria ricircolata – 70% aria espulsa) Classe II B2 (0% aria ricircolata – 100% aria espulsa)
Impieghi confinati al alto rischio	Barriera totale tra operatore e area di lavoro	Classe III (cappa con guanti) (0% aria ricircolata – 100% aria espulsa)

Tabella. 24

La scelta della cappa di sicurezza biologica è basata sul rischio potenziale dell'agente utilizzato, sulla possibilità che le operazioni di laboratorio possano generare aerosol e sulla necessità di proteggere l'operatore, l'ambiente o il prodotto da contaminanti aerotrasportati.

Secondo la tabella contenuta nell'Allegato IV del D. Lgs 206/01, che illustra le misure di contenimento, di prevenzione e altre misure di protezione per le attività di laboratorio, l'utilizzo delle cappe di sicurezza biologica si ritiene necessario nei laboratori che manipolano MOGM con livello di contenimento 3 e 4. Per quelli di livello di contenimento 2 il loro utilizzo è limitato alle operazioni per le quali il loro uso si ritiene necessario, mentre in quelli di livello di contenimento 1 il loro utilizzo non si ritiene necessario.

La scelta della cappa di sicurezza biologica è determinata dal rischio associato all'impiego confinato di MOGM.

Classi	Aria ricircolata	Aria espulsa	Plenum contaminato circondato da:	Sistema di espulsione	Livelli di biosicurezza
I	0%	100%	Aria esterna (laboratorio)	All'interno della stanza/ condotto diretto	1,2,3
II A1	70%	30%	Aria esterna (laboratorio)	Espulsione all'interno della stanza /attraverso manicotto	1,2,3
II A2	70%	30%	Pressione negativa	Condotto diretto/ attraverso manicotto	1,2,3
II B1	30%	70 %	Pressione negativa	Condotto diretto	1,2,3
II B2	0%	100%	Pressione negativa	Condotto diretto	1,2,3
III	0%	100%	Pressione negativa	All'interno della stanza/ condotto diretto	1,2,3,4

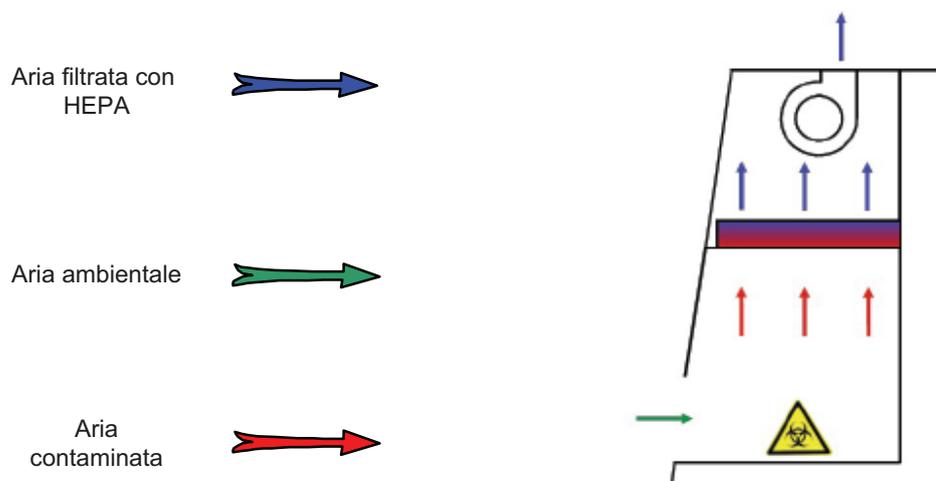
Tabella. 25 - Tipologia di Cappe di Sicurezza Biologica e loro specifiche tecniche

Filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air)

Le cappe di sicurezza biologica sono provviste di filtri HEPA che prevengono la contaminazione particellare costituiti da fogli di microfibre di vetro ripiegati più volte. La loro efficienza filtrante è rappresentata dalla capacità di trattenere particelle di 0,3 di diametro con un'efficacia compresa tra il 99,97% e il 99,99%. I filtri HEPA sono raggruppati in 5 classi (da H10 a H14) con caratteristiche prestazionali crescenti.

Cappe di sicurezza biologica di classe I

Cappa ventilata aperta frontalmente



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Figura. 14

Protezione

- operatore
- ambiente esterno

La protezione dell'operatore è assicurata dal flusso frontale di aria esterna convogliato come flusso laminare al di sopra del piano di lavoro che viene emesso dalla cappa attraverso un estrattore. In questo modo le particelle di aerosol, eventualmente generate nell'area di lavoro, vengono convogliate nell'estrattore ed allontanate dall'operatore e dall'ambiente. La protezione dell'ambiente è garantita da un filtro HEPA nel sistema di scarico. Poiché l'aria che penetra sul piano di lavoro attraverso l'apertura frontale non è sterile non si ritiene che questo tipo di cappa sia consistentemente affidabile per la protezione del prodotto.

L'apertura frontale permette alle braccia dell'operatore di raggiungere il piano di lavoro all'interno della cappa mentre egli segue le operazioni attraverso il vetro. Il vetro può anche essere completamente alzato per permettere la pulizia dell'area di lavoro o per altri scopi.

L'aria viene espulsa dalla cappa attraverso un filtro HEPA:

- all'interno del laboratorio e poi all'esterno attraverso gli estrattori dell'edificio;
- all'esterno attraverso gli estrattori dell'edificio;
- direttamente all'esterno.

Il filtro HEPA può essere posizionato nel plenum della cappa o sugli estrattori dell'edificio. Alcune cappe di sicurezza biologica di classe I sono dotate di un aspiratore integrato, mentre altre confidano sul sistema di aspirazione dell'edificio.

Caratteristiche

- Allarmi di sicurezza per ventilazione insufficiente.
- Velocità frontale d'aspirazione di almeno 0.4m/s.
- Contatore delle ore di utilizzo per controllo efficienza dei filtri.
- Ripiano con bordi rialzati per impedire eventuali travasi all'esterno.

Principale utilizzo

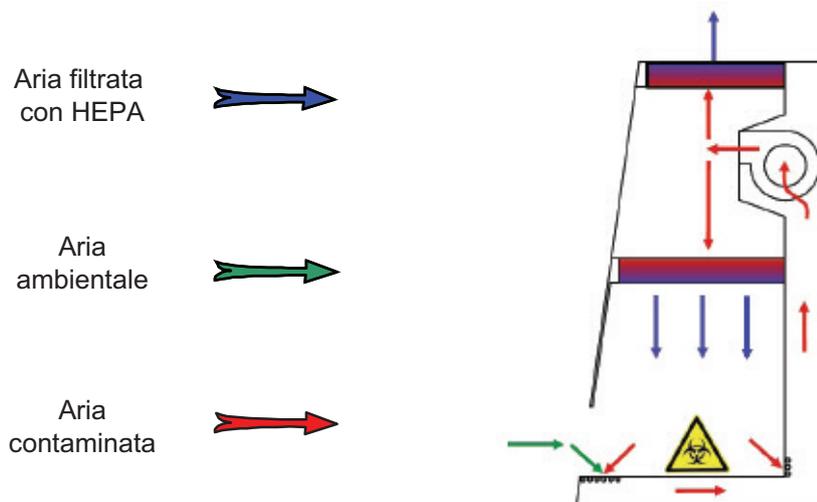
Confinamento di piccole strumentazioni (centrifughe, piccoli fermentatori) ed effettuazione di operazioni che possono generare aerosol (omogenizzazione di tessuti, areazione di colture).

Cappe di sicurezza biologica di classe II

Cappa a flusso laminare verticale

Esistono 4 tipologie di cappe di classe II, distinte in base alla percentuale di aria riciclata: Tipo A1, Tipo A2, Tipo B1, Tipo B2

Classe II Tipo A1



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Figura. 15

Protezione

- operatore
- ambiente esterno
- prodotto

La protezione dell'operatore è assicurata dal flusso frontale di aria esterna convogliato come flusso laminare al di sopra del piano di lavoro che viene filtrato attraverso un filtro HEPA in modo da minimizzare la possibilità di contaminazioni crociate per il prodotto. L'ambiente è protetto da un filtro HEPA che filtra l'aria emessa dalla cappa (Tipo A1 e A2). Tale aria, libera da particolato, può essere immessa nel laboratorio o liberata al di fuori dell'edificio attraverso il sistema di ventilazione.

Caratteristiche

- Allarmi di sicurezza per ventilazione insufficiente.
- Velocità frontale di aspirazione di almeno 0.4m/s.
- Contatore delle ore di utilizzo per il controllo dell'efficienza dei filtri.
- Aria in entrata filtrata attraverso filtro HEPA prima di essere immessa sul piano di lavoro.
- Interno della cappa in depressione.

- Aria in uscita filtrata da un filtro HEPA.

Specifiche del flusso d'aria per cappe di Classe II Tipo A1

- Aspirazione interna dell'aria dalla griglia frontale con velocità di flusso di almeno 0.4 m/s.
- Passaggio dell'aria attraverso filtro HEPA prima d'immissione dall'alto sul piano di lavoro.
- Flusso laminare dall'alto diffuso a circa 6-18 cm dal piano di lavoro (metà del flusso passa attraverso la griglia frontale di recupero dell'aria, metà passa attraverso griglia posteriore di estrazione).
- Aria espulsa: il 30% di aria, passa attraverso il filtro HEPA di scarico in uscita nel laboratorio o all'esterno.
- Aria ricircolata nell'area di lavoro all'interno della cappa: il 70% dell'aria, passa attraverso il filtro HEPA di entrata.

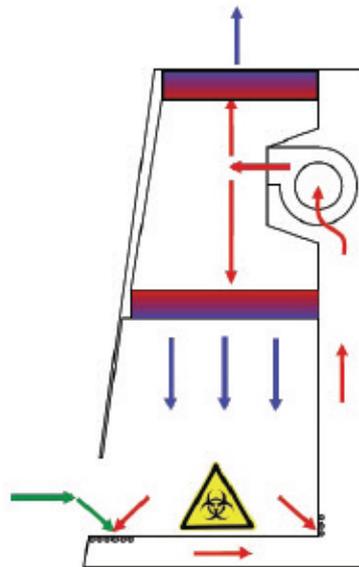
Principale utilizzo

Realizzazione di impieghi confinati di classe 2 e 3. Impieghi confinati che presentano un rischio basso e moderato, ovvero operazioni per le quali un livello 2 o 3 di contenimento è adeguato a proteggere la salute umana e l'ambiente. Possono essere utilizzate anche per piccole quantità di agenti chimici tossici non volatili e radionuclidi in tracce (eventualmente presenti in colture cellulari o sistemi microbici).

Precauzioni

- Non utilizzare la cappa tipo A1 con sostanze chimiche tossiche volatili. I vapori chimici possono accumularsi nella cappa (per ricircolo dell'aria) e nel laboratorio (per gas di scarico) creando rischi per la salute e la sicurezza.
- L'aria emessa da cappa di tipo A1 può essere espulsa fuori dall'edificio. Per non alterare il flusso della cappa stessa è necessario collegare la cappa stessa al sistema di estrazione dell'edificio attraverso un manicotto. Il volume di scarico dell'aria estratta dall'edificio deve essere sufficiente a mantenere il flusso di aria nel laboratorio e la differenza di pressione tra il manicotto e il sistema di filtrazione.

Classe II Tipo A2



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Figura. 16

Le cappe di sicurezza di Classe II A2 si differenziano da quelle di Classe II A1 per diversi aspetti:

- il sistema di espulsione, che determina se l'aria sia scaricata dalla cappa all'interno o all'esterno attraverso uno specifico sistema di estrazione o tramite quello dell'edificio;
- il gradiente di pressione (se le cappe hanno i plenum contaminati, a pressione positiva, circondati da un condotto a pressione negativa).

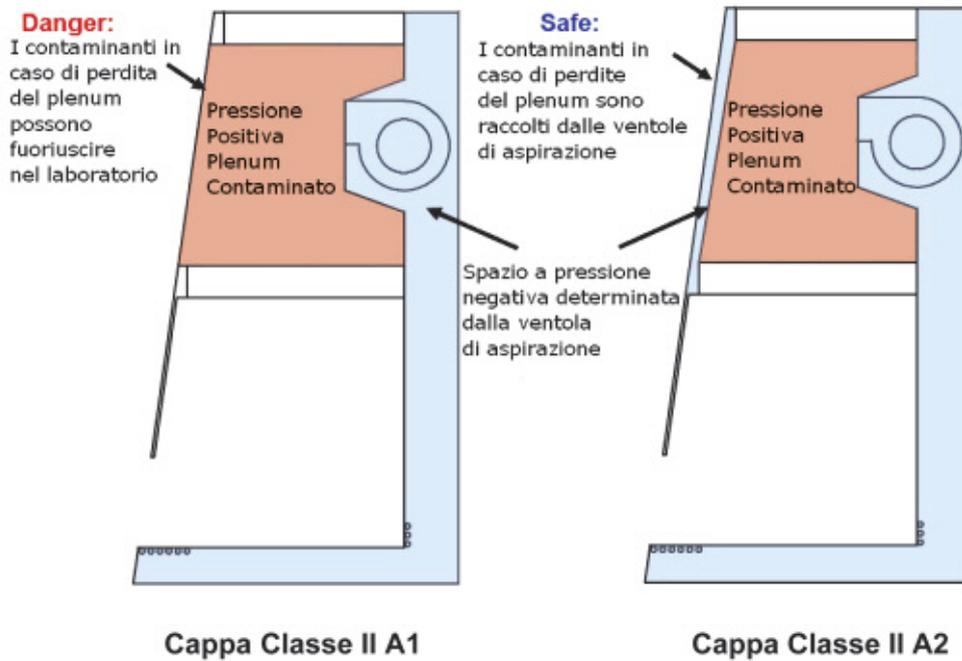
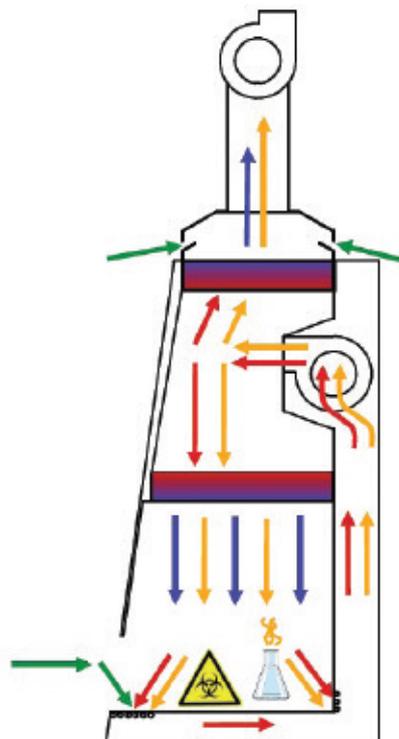


Figura. 17

Caratteristiche

- Aspirazione interna dell'aria dalla griglia frontale con velocità di flusso di almeno 0.5 m/s.
- Tutti i plenum contaminati sono circondati da una pressione d'aria negativa.
- Aria ricircolata: 70%; aria emessa da un comune plenum nella stanza: 30%.

Classe II Tipo B1



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Classe II Tipo B1

Figura. 18

Protezione

- operatore
- ambiente esterno
- prodotto

La protezione dell'operatore è assicurata dal flusso frontale di aria esterno convogliato come flusso laminare al di sopra del piano di lavoro che viene filtrato attraverso un filtro HEPA in modo da minimizzare la possibilità di contaminazioni crociate per il prodotto. L'ambiente è protetto da un filtro HEPA che filtra l'aria emessa dalla cappa. Tale aria, priva di particolato è espulsa, per le cappe del tipo B1 e B2, al di fuori dell'edificio attraverso il sistema di ventilazione "protetto".

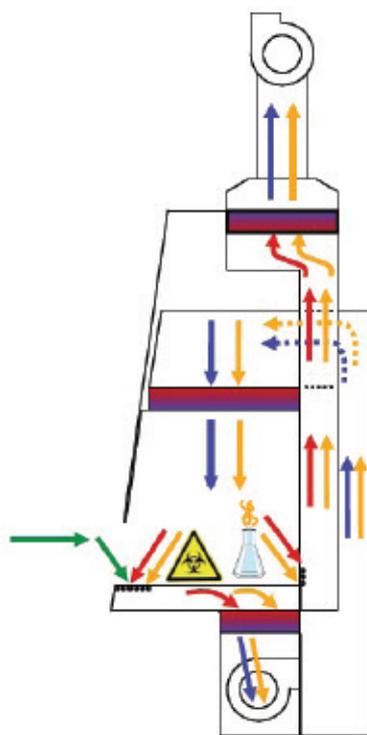
Principale utilizzo

Adatta all'impiego confinato di MOGM di classe 2 e 3, e all'utilizzo di concentrazioni maggiori di sostanze tossiche, volatili o radioattive rispetto alle cappe di classe II tipo A.

Caratteristiche

- Velocità di flusso almeno 0.4 m/s.
- Il 70% dell'aria immessa nella cappa viene emessa attraverso la griglia posteriore dopo passaggio nel filtro HEPA di scarico, e viene scaricata dall'edificio tramite un condotto dedicato connesso con l'impianto di ventilazione.
- Il restante 30% dell'aria viene ricircolata passando attraverso il filtro HEPA di entrata.
- I plenum contaminati biologicamente sono a pressione negativa rispetto alla stanza o sono circondati da pressione negativa.

Classe II Tipo B2



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Classe II Tipo B2

Figura. 19

Protezione

- operatore
- ambiente esterno
- prodotto

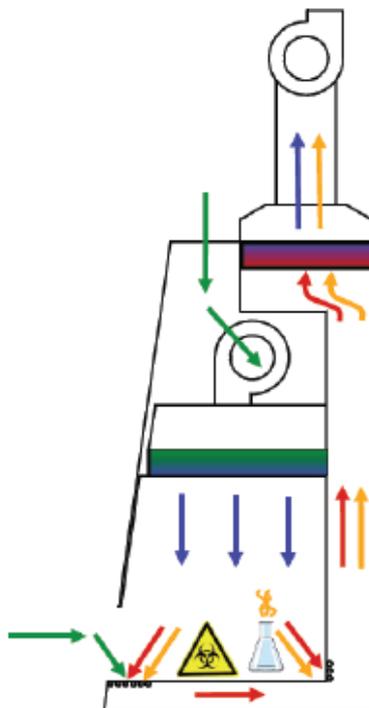
Caratteristiche

- 0% aria ricircolata; 100% aria emessa viene eliminata attraverso un condotto dedicato connesso con l'impianto di ventilazione dopo essere stata filtrata da filtro HEPA.
- Velocità di flusso 0.5 m/s.
- I plenum contaminati biologicamente sono a pressione negativa rispetto alla stanza o sono circondati da pressione negativa.

Principale utilizzo

È indicata per impiego confinato di MOGM di classe 2 e 3 e per colture cellulari trattate con sostanze cancerogene e/o mutagene o marcate con isotopi radioattivi. Possono essere usate quando è richiesta la manipolazione di piccole quantità di sostanze chimiche volatili in studi microbiologici.

Cappe a sicurezza biologica di classe III “glove box” (vedi sezione dedicata “isolatore”)



Fonte: ESCO WORLD CLASS WORLDWIDE

Figura. 20

Protezione

- operatore.
- ambiente di lavoro esterno alla cappa nei confronti degli agenti biologici.
- materiale in lavorazione da contaminazioni esterne.

La cabina *glove-box* è ermeticamente chiusa con ingresso d'aria filtrata attraverso filtri HEPA ed espulsa previa filtrazione attraverso doppi filtri HEPA in sequenza. Opera in pressione negativa e assicura la protezione totale del prodotto-operatore-ambiente.

Questo tipo di cappa garantisce il più alto livello di protezione personale ed è utilizzata per gli agenti patogeni appartenenti al gruppo 4. Il flusso dell'aria è garantito da uno specifico sistema di aspirazione esterno alla cappa, che mantiene una pressione negativa (circa 124,5 Pa) al suo interno. Guanti a manico lungo di gomma pesante posizionati frontalmente permettono l'accesso al piano di lavoro. Le cappe di classe III devono avere un box di passaggio a doppia porta interbloccante che può essere sterilizzato e dotato di filtro HEPA. La cappa di classe III può essere collegata ad un'autoclave passante ed usata per decontaminare tutto il materiale che entra o esce dalla cappa. Diversi *glove-box* possono essere uniti insieme per ampliare il piano di lavoro. Le cappe di classe III sono idonee per lavorare in laboratorio a livello di contenimento 3 e 4.

Caratteristiche

- Chiusura totale ed ermetica dotata di manicotti con guanti.
- Funzionamento a pressione negativa.
- Presenza di filtro HEPA sull'aria in ingresso ed di un doppio filtro HEPA sull'aria in uscita.

Manutenzione cappe di biologiche

Periodicità annuale

- Verifica e sostituzione dei filtri come previsto dal libretto d'uso e manutenzione.
- Verifica e pulizia delle tubazioni di scarico (ove presenti).
- Verifica del funzionamento elettrico e meccanico del motore dell'elettroventilatore (ove presente).
- Controllo delle ore di funzionamento dei filtri (ove possibile).
- verifica generale delle parti meccaniche (ad es. pannello frontale, saliscendi, ecc...), parti strutturali (es. integrità superfici e tubazioni), indicatori e allarmi (ove presenti), impianto elettrico, rubinetti, lampade UV (ove presenti).

- Misura della velocità di aspirazione con anemometro secondo norma UNI EN 12469.
- Verifica periodica della presenza di microrganismi nell'aria filtrata esponendo per 30 minuti delle capsule *Petri* aperte contenenti terreni di coltura per la crescita di batteri eterotrofi e di miceti, disposte in punti rappresentativi della superficie di lavoro o, in alternativa, usare contatori di particelle.

Cappe biologiche di classe III "glove box"

- Verifica e sostituzione dei filtri come previsto dal libretto d'uso e manutenzione.
- Verifica e pulizia delle tubazioni di scarico (ove presenti).
- Verifica del funzionamento elettrico e meccanico del motore dell'elettroventilatore (ove presente).
- Verifica ore funzionamento dei filtri (ove possibile).
- Verifica generale di parti strutturali (ad es. aperture alle quali vanno applicate i guanti, ecc.), indicatori e allarmi (ove presenti), impianto elettrico, rubinetti, lampade UV (ove presenti).
- Verifica della depressione interna secondo norma UNI EN 12469.
- Verifica della velocità dell'aria entrante da ciascuna delle aperture alle quali vanno applicate i guanti secondo norma UNI EN 12469.
- Verifica della portata d'aria secondo norma UNI EN 12469.

I filtri sostituiti devono essere eliminati come rifiuto speciale utilizzando il Codice CER 15.02.02.

Regole pratiche per l'uso delle cappe biologiche

L'uso delle cappe biologiche di sicurezza deve essere spiegato a tutti gli utilizzatori, con riferimento alla letteratura degli standard nazionali. Devono essere forniti agli operatori protocolli scritti o manuali di sicurezza relativi alle procedure.

Ad ogni uso della cappa è necessario osservare delle corrette prassi operative:

- accertarsi che la cappa sia idonea all'agente biologico utilizzato;
- verificare il perfetto funzionamento della stessa;
- spegnere lampada UV, se presente;
- prima di iniziare il lavoro posizionare il vetro frontale, se del tipo a scorrimento, all'altezza fissata per la maggiore protezione dell'operatore (20 – 30 cm), oppure, regolare l'altezza della sedia in modo che il volto dell'operatore sia al di sopra dell'apertura del vetro frontale. Il vetro che non deve essere aperto quando la cappa è in uso;
- accendere il sistema di aspirazione della cappa almeno 10 minuti prima di iniziare il lavoro in modo da stabilizzare il flusso e consentire l'eliminazione del particolato presente al suo interno;
- pulire con etanolo (EtOH) al 70%, o una soluzione (diluizione 1:100) di ipoclorito di sodio 0,05%, o altri disinfettanti la superficie di lavoro, le pareti interne e la superficie interna del vetro (se si usa ipoclorito è necessario effettuare un secondo lavaggio con acqua sterile per eliminare il cloro residuo, che può eventualmente corrodere le superfici in acciaio inossidabile);
- pulire con EtOH al 70% le superfici di tutti i materiali e contenitori immessi nella cappa per ridurre l'immissione di contaminanti microbici nell'area di lavoro;
- rispettare durante l'attività lavorativa un flusso "da pulito a contaminato", introdurre i materiali nella cappa limitando il movimento di materiale "sporco" verso aree o oggetti più "puliti";
- stilare, prima di iniziare a lavorare, una lista del materiale da introdurre nella cappa, strettamente necessario all'attività lavorativa, per evitare di interrompere più volte il flusso dell'aria con l'introduzione di nuovo materiale;
- ridurre al minimo indispensabile il materiale o le attrezzature sul piano di lavoro per non diminuire il flusso di aria ed evitare turbolenze, possibili contaminazioni incrociate, e/o violazioni del grado di contenimento;
- iniziare la manipolazione dei materiali dopo circa un minuto dall'immissione delle mani/braccia all'interno della cappa in modo da far stabilizzare il flusso d'aria nella cappa, ed effettuare l'"*air sweep*" delle mani e delle braccia per rimuovere i contaminanti microbici presenti sulla loro superficie. Quando le braccia dell'operatore sono poggiate sulla parte anteriore della griglia della cappa, il flusso di aria della stanza potrebbe convergere nell'area di lavoro, invece di essere aspirata attraverso la griglia frontale. Alzare leggermente le braccia potrà in parte risolvere il problema;
- non bloccare con pipette, fogli o altro materiale la griglia frontale dell'aria, per evitare potenziali contaminazioni del materiale e non esporre l'operatore a possibili contaminazioni;
- evitare movimenti bruschi degli avambracci all'interno della cappa per non alterare il flusso laminare della cortina d'aria compromettendo la parziale barriera di contenimento prevista. Spostare le braccia lentamente e perpendicolarmente al fronte di apertura della cappa consentirà di ridurre questo rischio;
- evitare il passaggio di persone alle spalle dell'operatore, l'apertura o la chiusura di porte nella stanza per non alterare il flusso laminare;
- eseguire tutte le operazioni di lavoro nella parte mediana e posteriore del piano di lavoro ed in modo visibile attraverso il vetro frontale. Inoltre, le apparecchiature che generano aerosol (vortex mixer, centrifughe da tavolo) devono essere situati nella parte posteriore della cappa per sfruttare il vantaggio dell'"*air split*". Oggetti ingombranti come sacchetti per rifiuti a rischio biologico, pipette usate e contenitori per la raccolta di rifiuti liquidi dovrebbero essere collocati in un lato interno della cappa;
- non usare bunsen o altri tipi di bruciatori sotto le cappe di tipo II e III poiché l'aria calda indotta può deviare il regolare flusso interno dell'aria, e quindi causare contaminazione dell'area di lavoro, dell'ambiente esterno e danni ai filtri HEPA. È consigliabile tenere un microinceneritore elettrico, ma è preferibile l'utilizzo di anse sterili monouso;
- estrarre il materiale potenzialmente infetto o contaminato in contenitori chiusi e a tenuta, perfettamente puliti all'esterno ed etichettati con il segnale di rischio biologico;

- non chiudere al di fuori della cappa il sacchetto per rifiuti a rischio biologico da autoclavare;
- decontaminare le superfici di tutti i contenitori e le attrezzature prima di essere rimossi dalla cappa quando il lavoro è stato completato;
- non portare fuori della cappa i materiali potenzialmente contaminati se non dopo essere stati decontaminati sulla superficie esterna; in alternativa i materiali contaminati possono anche essere messi in un contenitore a chiusura e trasferiti in incubatore, in autoclave o in altro dispositivo per la decontaminazione;
- lasciare la cappa in funzione per circa 20 minuti al termine del lavoro per eliminare eventuali contaminazioni;
- pulire e disinfettare la cappa ad ogni fine lavoro con prodotti idonei. La superficie di lavoro, le pareti interne e la superficie interna del vetro devono essere puliti con etanolo (EtOH) al 70%, o una soluzione (diluizione 1:100) di ipoclorito di sodio 0,05%, o altri disinfettanti. Quando viene utilizzato ipoclorito è necessario effettuare un secondo lavaggio con acqua sterile per eliminare il cloro residuo, che può corrodere le superfici in acciaio inossidabile. Se necessario, la cappa deve essere monitorata per la radioattività e la decontaminazione;
- chiudere l'apertura frontale quando la cappa biologica non è utilizzata, eventualmente accendere lampada a raggi UV;
- rimuovere immediatamente con carta assorbente imbevuta di soluzione di decontaminazione gli eventuali piccoli versamenti del materiale contaminato nella cappa (cambiare i guanti dopo la decontaminazione e metterli, insieme alla carta utilizzata per la pulizia, nel materiale da autoclavare); in caso di versamenti di maggiore entità (liquidi che attraversano la parte anteriore o posteriore delle griglie) tutti gli elementi all'interno della cappa devono essere rimossi e decontaminati e la soluzione decontaminante deve essere versata sulla superficie di lavoro e attraverso la griglia nella vaschetta;

Nel caso di decontaminazione con gas il metodo più comune utilizza la formaldeide, e il perossido idrogeno

Decontaminazione delle cappe biologiche con formaldeide

Viene effettuata mediante nebulizzazione con i vapori di formaldeide (60 ml di formalina e 60 ml di acqua per 1 m³ di cabina) a 21°C e con umidità relativa del 70% (dopo il processo è consigliabile l'inattivazione con ammoniaca).

L'operatore addetto a tale attività deve indossare i DPI necessari ed esporre segnaletica idonea all'esterno del locale.

Procedura

- Disporre all'interno della cappa un bunsen di sicurezza alimentato a gas (o piastra elettrica).
- Chiudere il foro di espulsione.
- Far evaporare la soluzione di formaldeide in acqua dopo aver chiuso anche il vano anteriore della cappa.
- Mettere la cappa in funzione mentre evapora la formaldeide.
- Spegnerne il bunsen e permettere la completa evaporazione per un minimo di 3 h.
- Aprire il vano e il foro e rimettere in funzione la cappa.

AUTOCLAVE

La sterilizzazione a vapore

Processo comprovato, rapido ed economico per uccidere microrganismi, mediante l'applicazione di calore umido (vapore saturo) sotto pressione. Il calore danneggia diverse strutture cellulari compresa la membrana citoplasmatica rendendo le cellule non vitali.

L'azione biocida deriva dall'ossidazione dei costituenti cellulari con denaturazione degli enzimi e delle strutture proteiche. La sensibilità al calore varia in rapporto al contenuto in H₂O del materiale: più è alta la concentrazione di H₂O, più i microrganismi risultano sensibili al calore.

Il tempo di sterilizzazione diminuisce con l'aumentare della temperatura.

Caratteristiche tecniche

- coperchio termoisolante;
- scaricamento automatico sul retro del vapore;
- istruzioni d'uso sul frontale;
- valvola automatica per una distribuzione uniforme del vapore saturo;
- segnali di malfunzionamento;
- predisposizione per termosonda ai fini della validazione ciclo;
- valvola per lo sfiato del vapore;
- requisiti e norme per la sicurezza.

L'Allegato IV del D. Lgs 206/01 stabilisce che l'autoclave:

- in laboratorio a livello di contenimento 1 sia presente nel sito;
- in un livello di contenimento 2 sia presente nell'edificio;
- in livello di contenimento 3 sia sul piano in base a procedure convalidate che consentano il trasferimento sicuro del materiale in un'autoclave al di fuori del laboratorio e che forniscano un livello di protezione equivalente;
- in un livello di contenimento 4 sia presente in laboratorio.

La **sterilizzazione** (Tabella. 26) è il processo chimico o fisico in grado di distruggere tutte le forme di microrganismi viventi (su materiali perfettamente asciutti) che si attua tramite:

- **Mezzi fisici:** calore, filtrazione, radiazioni ionizzanti
- **Mezzi chimici:** disinfettanti -> Completa e radicale denaturazione delle proteine e del DNA o RNA microbico. Interferiscono con i processi vitali dei microrganismi in modo irreversibile e selettivo

STERILIZZAZIONE						
Procedura fisica o chimica che distrugge tutti i microrganismi, incluso un largo numero di spore batteriche altamente resistenti						
Metodi di sterilizzazione secondo l'OMS						
Metodi				Applicazioni	Raccomandazioni	Svantaggi
Agenti	Mezzi	T°C	Tempo			
Calore a secco	Stufa a secco	160-180	130-180 min	Metallo, vetro, olio, talco	Frequenti controlli	Non adatto per i tessuti
Calore umido	Autoclave	121-134	20 min	Metallo, vetro, tessuti, gomma che tollerano i 134°C	Creare il vuoto prima della partenza. Completa saturazione e perfetta asciugatura.	L'evacuazione dell'aria è difficile se la pompa è inadeguata
Ossido di Etilene	Autoclave	20-60	Dipendente dal tipo di attrezzature	Oggetti che non tollerano i 120°C o l'eccessiva umidità	Impacchettamenti speciali. Aerazione necessaria per oggetti di materiale assorbente. Controlli sui residui.	Gas tossico ed infiammabile
Formalina	Autoclave	60-80	Dipendente dal tipo di attrezzature	Oggetti che non tollerano i 134°C	Impacchettamento che permetta la penetrazione di formalina	Poca capacità penetrante alla umidità relativa: 90%
Raggi gamma	Acceleratore lineare di cobalto 60			Plastica prodotta in serie	Oggetti a perdere	Usati per prodotti industriali. Risterilizzazioni problematiche

Tabella. 26

La sterilizzazione comprende diverse fasi:

- Raccolta
- Decontaminazione
- Lavaggio (manuale, automatico, ad ultrasuoni)
- Risciacquo (acqua corrente e demineralizzata)
- Asciugatura (pistole ad aria compressa)
- Confezionamento
- Sterilizzazione
- Conservazione materiali sterilizzati

Per ogni fase è necessario indossare gli idonei DPI.

Esempi di autoclavi con caratteristiche diverse:

Autoclavi a dislocamento per gravità

Il vapore entra sotto pressione nella camera, sposta verso il basso l'aria più pesante, ed esce attraverso la valvola dello scarico, equipaggiata con filtro HEPA.

Autoclavi a prevuoto

Queste macchine permettono la rimozione di aria dalla camera prima di immettere vapore. L'aria viene evacuata attraverso una valvola dotata di filtro HEPA. Alla fine del ciclo, il vapore viene allontanato automaticamente. Queste autoclavi possono operare a 134°C, e di conseguenza il ciclo di sterilizzazione può essere ridotto a 3 minuti. Sono ideali per materiali porosi, ma non possono essere usate per trattare liquidi a causa della presenza del vuoto.

Fasi del procedimento di sterilizzazione:

- rimozione dell'aria dalla camera;

- immissione del vapore;
- raggiungimento della temperatura;
- sterilizzazione;
- asciugatura;
- introduzione di aria pulita con filtro HEPA.

Procedimento di sterilizzazione	
Calore umido	
Ciclo 121° C-1 atm	Ciclo 134° C-2 atm
12 minuti per la penetrazione del vapore	1 minuto per la penetrazione del vapore
12 minuti per la sterilizzazione	2 minuti per la sterilizzazione
6 minuti per il fattore di sicurezza	1 minuto per il fattore di sicurezza
Totale 30 minuti	Totale 4 minuti

Tabella. 27

Per un corretto uso dell'autoclave si raccomanda di seguire la seguente procedura:

- controllare il livello dell'acqua e, se necessario, ripristinarlo con acqua demineralizzata;
- inserire le bottiglie dei terreni da autoclavare con i coperchi leggermente aperti;
- se possibile inserire il materiale da autoclavare nell'apposito cestello;
- i recipienti da autoclavare dovranno essere muniti dell'apposito nastro per autoclave;
- fare attenzione che il coperchio sia ben posizionato e che la valvola sia completa;
- chiudere bene a fondo la manopola del coperchio dell'autoclave;
- far partire l'autoclave visualizzando l'aumento della pressione sull'apposito manometro;
- controllare che non venga mai superata la pressione di 1 atmosfera;
- se per caso l'acqua dovesse finire, cosa avvertibile con l'assenza di sfiato, spegnere immediatamente l'autoclave;
- fare attenzione a non toccare l'autoclave durante l'uso onde evitare gravi ustioni;
- una volta trascorso il tempo previsto per la sterilizzazione spegnere l'autoclave;
- non aprire mai lo sfiato per accelerare il raffreddamento;
- aprire l'autoclave solo quando il manometro è arrivato a zero;
- fare attenzione al vapore quando si solleva il coperchio;
- prelevare i campioni autoclavati con gli appositi guanti, chiudere subito il coperchi e controllare il nastro da autoclave;
- richiudere l'autoclave e staccare l'interruttore;
- periodicamente, o quando si reputi necessario, pulire l'autoclave.

Esempi di materiali che devono essere autoclavati prima dello smaltimento:

- colture e stock di agenti biologici infettivi;
- materiale e dispositivi connessi alla colture di materiale biologico e alla loro manipolazione;
- materiale solido contaminato (es. asciugamani di carta, stoffa, pipette, fiasche e contenitori, bottiglie piastre *Petri* e guanti).

Scarico sicuro dell'autoclave

A ciclo completo, attendere fino a quando il manometro della camera di pressione sia zero prima di aprire l'autoclave. Attendere alcuni minuti prima di rimuovere i sacchetti dall'autoclave per lasciar raffreddare ulteriormente eventuali liquidi o residui di agar fuso che possono essere fuoriusciti nel contenitore secondario durante il ciclo. Usare particolare cautela per contenitori che possono essere stati sotto pressione. Non porre in autoclave un contenitore di liquidi sigillato ciò potrebbe causare un'esplosione a causa di un eccesso di riscaldamento del liquido durante il ciclo o quando il contenitore viene aperto.

Buone pratiche di laboratorio

- usare attrezzature di protezione individuale (DPI):
 - ✓ guanti resistenti al calore per il carico e lo scarico dell'autoclave;
 - ✓ guanti resistenti ai liquidi per eliminare il contatto con i rifiuti contaminati;
 - ✓ camice;
 - ✓ occhiali nel caso di pericolo di schizzi.
- minimizzare la formazione di aerosol;

- prevenire la fuoriuscita dei rifiuti in autoclave durante il carico e lo scarico;
- prevenire le ustioni dovute alla manipolazione del materiale autoclavato;
- attenersi alle procedure per la gestione di sversamenti.

Per una sterilizzazione efficiente è necessario:

- **un corretto imballaggio** che assicuri che il vapore penetri nei rifiuti stessi considerata la relazione che esiste tra la densità del carico e la penetrazione del vapore (sacchetti, confezionati al limite della loro capacità non saranno adeguatamente decontaminati in autoclave). Se sono utilizzati sacchetti in polipropilene devono essere lasciati aperti durante la sterilizzazione in autoclave poiché il polipropilene è impermeabile al vapore, e se il sacchetto fosse chiuso durante il processo di sterilizzazione, la temperatura interna del sacchetto non sarebbe sufficiente per la decontaminazione. Inoltre tali sacchetti devono essere messi in contenitori rigidi per evitare o contenere le fuoriuscite.
- **un corretto caricamento nella autoclave formattazione**
 - ✓ È importante caricare correttamente l'autoclave per consentire al vapore di circolare liberamente in tutta la camera e non sovraccaricare la camera con sacchetti che siano troppo grandi per la capacità dell'autoclave.
 - ✓ Oggetti puliti e contaminati possono essere sterilizzati nella stessa autoclave, ma non durante lo stesso ciclo perché necessitano di calore a diversi tempi di esposizione.
 - ✓ Non mettere mai oggetti taglienti in un sacchetto di rischio biologico. Tutti i taglienti devono essere smaltiti in contenitori rigidi deputati, che saranno inceneriti.

- **un corretto funzionamento autoclave**

Annualmente è necessario effettuare un test di verifica per determinare il tempo, la pressione e la temperatura di sicurezza adeguate per decontaminare i rifiuti attraverso l'uso di un indicatore biologico (spore di *Bacillus stearothermophilus*), inattivato a 121° C. Per la prova, autoclavare fiale di *B. stearothermophilus* insieme con un carico di rifiuti. Al completamento del ciclo, incubare le fiale per 48 ore, e gli eventuali segni di crescita osservati indicano che l'autoclave non sterilizza correttamente. Se ciò si verifica, l'autoclave deve essere ritestata per un ciclo di tempo che consenta una avvenuta decontaminazione.

Possibili cause di fallimento della sterilizzazione

Può essere dovuto a due fattori:

1. Errori dell'operatore:

- uso improprio dei contenitori che bloccano l'accesso del vapore al materiale caricato;
- chiusura dei sacchetti di polipropilene;
- non aggiunta di acqua al carico prima di autoclavare;
- sacchetto di rifiuti troppo grande per l'autoclave;
- sacchetto eccessivamente riempito.

2. Avaria meccanica

In questo caso rivolgersi al servizio tecnico di manutenzione

Manutenzione

È importante nell'uso di un'autoclave non ignorare i segnali delle funzioni di controllo della sicurezza, se si sospetta un problema di performance contattare l'assistenza tecnica.

I controlli dello stato di sicurezza devono essere effettuati dagli enti preposti secondo le disposizioni legislative vigenti.

La taratura va effettuata almeno con frequenza annuale controllando la correlazione tra pressione e temperatura tramite un manometro campione certificato oppure deve essere realizzata da ditte specializzate che rilascino idoneo documento di avvenuta taratura.

La manutenzione richiede la valutazione di diversi parametri:

- **efficienza del termometro nelle condizioni operative**
impostare la temperatura e il tempo di durata dei cicli richiesti e controllare che, quando l'autoclave è in pressione, il valore di temperatura sia conforme a quello riportato sulla tabella di correlazione pressione/temperatura del vapore saturo;
- **efficienza del blocco del portello nelle condizioni di esercizio**
controllare che, quando è in corso il ciclo di sterilizzazione, il dispositivo di blocco del portello rimanga bloccato e il portello non si apra;
- **livello dell'acqua**
prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione controllare che il livello dell'acqua nell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello;

- **funzionalità dello sfiato**
mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato;
- **stato di conservazione della guarnizione del portello**
verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici;
- **efficienza della valvola di sicurezza**
impostare un valore di pressione superiore al valore indicato dall'indice rosso sul manometro e controllare che, prima di raggiungere tale valore, la valvola di sicurezza cominci a sfiatare;
- **controllare - dispositivo elettronico di livello**
mentre l'autoclave è in funzione, scaricare lentamente l'acqua aprendo il rubinetto di scarico e verificare che raggiunto il livello minimo intervenga l'allarme e si accenda la spia di segnalazione;
- **efficienza dei processi di sterilizzazione**
utilizzare indicatori biologici come strisce o ampole di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile
- **ispezionare la camera**
ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni.

CENTRIFUGHE

Tipologie differenti di centrifughe si differenziano in base a specifici parametri di centrifugazione come la velocità massima, l'accelerazione, il tempo di centrifugazione, il volume massimo, il profilo di frenata. Un microprocessore riconosce il rotore montato e ne inserisce automaticamente le caratteristiche come raggio di centrifugazione, valore della velocità massima, etc. (Tabella. 28).

Per un adeguato contenimento le centrifughe hanno bisogno di accessori aggiuntivi, quali i contenitori di sicurezza o rotori di contenimento. Alcune centrifughe e altre attrezzature, quali cell-sorting usati con cellule infette, per un contenimento efficiente, possono necessitare di una ventilazione aggiuntiva a scarico locale con filtraggio HEPA.

<i>Tipologia</i>	<i>Velocità (rpm)</i>
Microcentrifuga	~ 15,000
Low/high speed	2,000 – 20,000
Ultracentrifuga	~ 120,000

Tabella. 28

Procedure operative:

- Controllare l'efficace funzionamento meccanico della centrifuga.
- Seguire le indicazioni riportate sul manuale di istruzioni ed effettuare periodica manutenzione.
- Collocarle in modo che siano accessibili e che i lavoratori possano ben vedere l'interno della camera del rotore, per posizionare correttamente portacestelli e cestelli.
- Bilanciare i contenitori e gli accessori da centrifuga con liquidi non corrosivi es. acqua distillata, alcool (propanolo al 70%).
- 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 con un codice stabilito.
- Le provette ed i contenitori dei campioni da centrifugare devono essere chiusi in modo sicuro.
- Lo spazio vuoto da lasciare tra la superficie del fluido e l'orlo della provetta da centrifuga dovrebbe essere indicato nelle istruzioni fornite dal fabbricante (osservare il limite di riempimento delle provette da centrifuga secondo quanto indicato dal fabbricante).
- Quando si usano rotori ad angolo fisso fare attenzione a non riempire troppo le provette, per evitare dispersione di materiale (es. liquidi).
- 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.
- I cestelli devono essere caricati, equilibrati, sigillati ed aperti 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 riporli capovolti per permettere la fuoriuscita della condensa.

- Ispezionare quotidianamente la camera interna della centrifuga per cercare macchie o sporco a livello del rotore. In presenza di macchie o sporco è necessario rivedere i protocolli di centrifugazione.
- Decontaminare cestelli, rotori e camera interna della centrifuga al termine di ogni utilizzo.

In caso di **incidente**

- In caso di rottura di provette e dispersione del materiale nella camera interna della centrifuga durante il suo funzionamento, fermare la rotazione ed attendere almeno 30 minuti prima dell'apertura per permettere la deposizione delle particelle di aerosol prodotte. Se la rottura viene rilevata a centrifuga già ferma, il rotore dovrebbe essere sostituito immediatamente e lasciato chiuso per 30 minuti.
- Per tutte le operazioni di intervento devono essere indossati i DPI adeguati (guanti resistenti di gomma) e procedure operative adeguate come rimuovere pezzi della provetta con pinze.

Possibili rischi per l'operatore:

- Rottura meccanica della centrifuga.
- Rottura dell'equipaggiamento di laboratorio (ad es. provette...).
- Generazione di aerosol.
- Errori dell'operatore.

INCUBATORE

Il corretto uso di un incubatore prevede di:

- collocare lo strumento in zona protetta dalla luce solare diretta;
- evitare l'introduzione di grandi quantità di materiale lasciando spazi per permettere la circolazione dell'aria;
- provvedere ad una manutenzione di pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione;
- controllare giornalmente la temperatura dell'incubatore con un termometro oppure, qualora ne sia dotato, controllare la temperatura indicata dal termometro permanente installato sull'apparecchiatura (la deviazione tra la temperatura impostata e quella rilevata non dovrà essere superiore a $\pm 1^\circ\text{C}$ per i termostati/frigotermostati impostati a 20°C , a 36°C e a 44°C);
- provvedere alla taratura del termometro permanente, attraverso un termometro di riferimento certificato (tarato annualmente da un centro SIT).

Flusso del personale e procedure operative

Procedura di accesso all'impianto di classe 3

Solo il personale che deve eseguire operazioni con MOGM di classe 3 relative a programmi di ricerca o diagnostici, ha l'autorizzazione all'accesso. Tale personale deve essere istruito sulle procedure operative, in modo da essere in grado di operare correttamente nel laboratorio di livello di contenimento 3.

Ingresso:

- controllare il manometro per assicurarsi che nel laboratorio esista pressione negativa;
- davanti la prima porta di accesso può essere presente un tappeto decontaminante indispensabile a ridurre l'inquinamento degli ambienti e delle superfici soggette a rischio microbico come all'ingresso di ogni ambiente dove è richiesta un'elevata asepsi;
- accesso controllato ad esempio mediante lettore di un badge elettronico nelle vicinanze della porta di ingresso;
- la porta di ingresso può aprirsi solo dopo aver ottenuto l'abilitazione.

Spogliatoio:

La vestizione avviene prima della riga gialla o eventuale panca.

- indossare cuffia all'interno della quale inserire i capelli che devono essere legati;
- lavare le mani (è consigliato sapone sterile a base di etanolo o materiale di equivalente efficacia, i tempi e le modalità di applicazione del sapone devono essere quelli riportati dal produttore).
- indossare il primo paio di guanti e solo successivamente il camice. Come regola generale, il primo paio di guanti deve essere indossato per primo e tolto per ultimo, (usare preferibilmente guanti di vinile a contatto con la pelle);
- indossare il sovracamice in tyvek (azzurro/verde) con polsi elasticizzati;
- proteggere delle membrane mucose mediante l'uso di mascherina e di occhiali di protezione o schermo antischizzi.
- indossare i sovrascarpe stando seduti sulla panca (passare una gamba alla volta nella zona pulita solo dopo aver messo il corrispondente sovrascarpe, evitando di calpestare la zona sporca);
- superare la linea gialla o la panca;
- accedere alla camera di compensazione.

Air-lock (camera di compensazione):

- accedere alla camera di compensazione dallo spogliatoio;
- attendere che la porta si chiuda per poter accedere al laboratorio (nel caso le due porte siano aperte contemporaneamente suona un allarme ottico-acustico);
- accedere al laboratorio.

Laboratorio:

- Prima di lavorare sotto cappa è necessario indossare il secondo paio di guanti con eventuali coprimaniche, che deve essere sostituito spesso: ogni qualvolta si ritiene possa esserci stata una eventuale contaminazione e quando si sospende la manipolazione del materiale infetto.
- Al termine dell'attività lavorativa e dopo la raccolta del materiale da autoclavare si può procedere a scartare il paio di guanti più esterni ed eventuali coprimaniche.

Procedura di uscita

- uscire dal laboratorio attraverso la camera di compensazione;
- accedere allo spogliatoio;
- togliere sovrascarpe e sovracamice (o tuta), mascherina, cuffia, occhiali ed il secondo paio di guanti e gettarli nell'ecobox;
- togliere il camice;
- lavarsi accuratamente le mani;
- uscire attraversando l'accesso controllato.

Dispositivi di protezione individuale (DPI)

Tutto il personale operante in un laboratorio a contenimento di classe 3 deve indossare:

- camice o tuta (ad es: in area produzione) disposable in tyvek;
- abiti da lavoro tipo “pigiamama” da chirurgo o camice;
- occhiali di sicurezza;
- guanti in lattice usa e getta;
- doppio paio di guanti (avendo cura di coprire il polsino del camice con il primo paio di guanti, in modo da non lasciare scoperto il polso);
- soprascarpe;
- cuffia;
- mascherina;
- maschera, guanti e grembiule di sicurezza per la manipolazione di azoto liquido;
- guanti per autoclave.

Norme di comportamento

- indossare sempre i dispositivi di protezione individuale (DPI);
- evitare l’uso di recipienti in vetro, aghi o forbici al fine di ridurre il rischio di ferite o abrasioni con materiale infetto. Tali materiali non devono essere presenti, se non strettamente necessari;
- non portare oggetti alla bocca, non toccarsi occhi e viso; è vietato l’uso di pipettare a bocca, utilizzare i pipettatori;
- manipolare agenti biologici utilizzando sempre le cappe di sicurezza biologica;
- etichettare correttamente tutti i recipienti in modo che si possa riconoscere il contenuto anche a distanza di tempo;
- prima di manipolare qualsiasi agente biologico non noto raccogliere tutte le informazioni possibili e comunicarle al proprio responsabile;
- utilizzare due contenitori per il ghiaccio, uno che risiederà stabilmente nel laboratorio e un altro che servirà per il prelievo del ghiaccio dalla macchina posta al di fuori del laboratorio. L’acqua che rimane dopo l’utilizzo del ghiaccio che potrebbe essere venuta a contatto con materiale infetto, deve essere inattivata con ipoclorito di sodio e quindi smaltita tra i rifiuti liquidi;
- lavorare con calma, soprattutto durante la manipolazione di materiale biologico;
- non lavorare mai soli in laboratorio, specialmente fuori dai normali orari di lavoro ed in caso di operazioni complesse o pericolose;

Si ricorda che restano valide tutte le norme previste dalla buona prassi di laboratorio, ovvero:

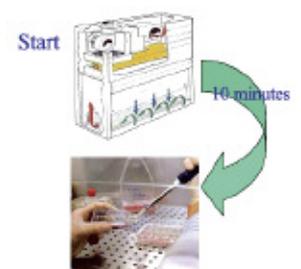
- nei laboratori è vietato fumare, conservare ed assumere cibi e bevande (incluso caramelle e chewing gum);
- rispettare le elementari norme igieniche, per es. lavarsi le mani prima, nel caso si debbano manipolare cellule o materiale biologico potenzialmente infettabile da batteri o altro, e alla fine del lavoro;
- leggere il manuale delle istruzioni prima di utilizzare qualsiasi apparecchio; non utilizzare apparecchiature elettriche non a norma e tenerle il più lontano possibile da fonti di umidità e/o vapori di solventi infiammabili;
- non lasciare mai senza controllo reazioni in corso o apparecchi, in funzione e nel caso munirli di opportuni sistemi di sicurezza;
- accertarsi, prima di lasciare il laboratorio, che il proprio posto di lavoro sia pulito ed in ordine e che tutti gli apparecchi, eccetto quelli necessari, siano spenti;
- informare tempestivamente il proprio responsabile di eventuali problemi, incidenti e malfunzionamento degli strumenti presenti in laboratorio.

Attività all’interno del laboratorio

Prima di iniziare il lavoro posizionare il vetro frontale, se del tipo a scorrimento, all’altezza fissata per la protezione dell’operatore (20 – 30 cm), e regolare l’altezza della sedia in modo che il volto dell’operatore sia al di sopra dell’apertura del vetro frontale. Il vetro non deve essere aperto quando la cappa è in uso.



Accendere il sistema di aspirazione della cappa almeno 10 min prima di iniziare il lavoro in modo da stabilizzare il flusso e consentire l’eliminazione del particolato presente al suo interno. Lasciare la cappa in funzione per circa 20 min al termine del lavoro per eliminare eventuali contaminazioni.



Pulire le superfici della cappa ad ogni inizio e fine lavoro con etanolo (EtOH) al 70%, o una soluzione (diluizione 1:100) di ipoclorito di sodio 0,05%, o altri disinfettanti.

Pulire con EtOH al 70% le superfici di tutti i materiali e contenitori immessi nella cappa per ridurre l'immissione di contaminanti microbici nell'area di lavoro.



Iniziare la manipolazione dei materiali dopo circa 1 min dall'immissione delle mani/braccia all'interno della cappa in modo da far stabilizzare il flusso d'aria nella cappa, ed effettuare l'"air sweep" delle mani e delle braccia per rimuovere i contaminanti microbici presenti sulla loro superficie.

Non poggiare le braccia sulla parte anteriore della griglia della cappa, il flusso di aria della stanza potrebbe convergere nell'area di lavoro, invece di essere aspirata attraverso la griglia frontale. Evitare movimenti bruschi degli avambracci all'interno della cappa per non alterare il flusso laminare della cortina d'aria e spostare le braccia lentamente e perpendicolarmente al fronte di apertura della cappa.



Rispettare durante l'attività lavorativa un flusso "da pulito a contaminato", introdurre i materiali nella cappa limitando il movimento di materiale "sporco" verso aree o oggetti più "puliti".

Stilare, prima di iniziare a lavorare, una lista del materiale da introdurre nella cappa, ridurre al minimo indispensabile il materiale o le attrezzature sul piano di lavoro per non diminuire il flusso di aria ed evitare turbolenze, possibili contaminazioni incrociate e/o violazioni del grado di contenimento.



Non usare bunsen o altri tipi di bruciatori sotto le cappe di tipo II e III, l'aria calda indotta può deviare il regolare flusso interno dell'aria, e causare contaminazione dell'area di lavoro, dell'ambiente esterno e danni ai filtri HEPA.



Eseguire tutte le operazioni di lavoro nella parte mediana e posteriore del piano di lavoro ed in modo visibile attraverso il vetro frontale.

Le apparecchiature che generano aerosol (vortex mixer, centrifughe da tavolo) devono essere situate nella parte posteriore della cappa per sfruttare il vantaggio dell'"air split". Oggetti ingombranti (contenitori per la raccolta di rifiuti liquidi e solidi) dovrebbero essere collocati in un lato interno della cappa.



Evitare il passaggio di persone alle spalle dell'operatore, l'apertura o la chiusura di porte nella stanza per non alterare il flusso laminare.



Non bloccare con pipette, fogli o altro materiale la griglia frontale dell'aria, per evitare potenziali contaminazioni del materiale e non esporre l'operatore a possibili contaminazioni.



Inattivazione rifiuti liquidi: il materiale liquido deve essere raccolto in contenitori di plastica, in cui è stata aggiunta una quantità di ipoclorito di sodio corrispondente al 20% del volume finale. Quando il volume all'interno del contenitore raggiunge la metà o i due terzi della sua capacità, procedere ad autoclavare il materiale. Assicurarsi che il contenitore sia chiuso con un tappo prima di rimuoverlo dalla cappa.

Eliminazione rifiuti solidi: i rifiuti solidi prodotti durante le attività di lavoro devono essere eliminati in sacchetti autoclavabili per rifiuti ospedalieri (sacchetti biohazard). Le fiasche per colture cellulari e le piastre *Petri* devono essere chiuse prima dell'eliminazione, mentre le pipette devono essere inserite in un doppio sacchetto biohazard.

Non chiudere al di fuori della cappa il sacchetto per rifiuti a rischio biologico da autoclavare.

Conservare i campioni biologici.

Chiudere l'apertura frontale quando la cappa biologica non è utilizzata, eventualmente accendere lampada a raggi UV.

Autoclavare i rifiuti eliminati o direttamente all'interno del laboratorio se presente un'autoclave passante, o sul piano dove è prevista l'autoclave.

USO DEI DISPOSITIVI DI PROTEZIONE

L'uso dei DPI deve avvenire quando i rischi non possono essere ridotti in modo sufficiente o evitati dall'applicazione di tecniche di prevenzione, da mezzi di prevenzione collettiva e da modalità o misure di organizzazione dell'attività lavorativa. La scelta di adeguati DPI deve avvenire sulla base dell'analisi e della valutazione del rischio. Essi devono essere specifici per le diverse tipologie di rischio, essere corredati di marcatura CE per la protezione da agenti biologici, ai sensi del D. Lgs. 475/92 e/o della Direttiva 686/89 CE. Inoltre devono essere classificati in III categoria ed avere la conformità alla EN 14126. Nel caso di protezione da patologie infettive emergenti di rilievo devono essere monouso.

La protezione da agenti biologici deve rispondere a delle regole quali:

1. proteggere parti anatomiche esposte (base del collo, busto, braccia, gambe);
2. la lunghezza dei camici deve essere almeno al di sotto del ginocchio, le maniche devono essere lunghe con i polsini provvisti di elastici per aderire ai polsi ed impedire l'esposizione della parte interna delle braccia;
3. la progettazione di indumenti costituiti da più parti deve essere tale da garantire protezione in tutte le prevedibili posture di lavoro;
4. qualsiasi indumento deve assicurare un'adeguata protezione lungo le parti di chiusura;
5. gli indumenti devono essere indossati per tutto il tempo in cui permane il rischio di esposizione;
6. ogni indumento di protezione deve essere accompagnato da una nota informativa nella quale deve essere evidenziato il possesso delle proprie caratteristiche e specifiche tecniche;
7. gli indumenti di protezione per gli agenti biologici dei gruppi 3 e 4 devono avere le parti di chiusura posizionate sul retro;
8. nel caso di manipolazione di agenti biologici di gruppo 3 è consigliabile la tuta intera, obbligatoria per gli agenti di gruppo 4;
9. gli indumenti di protezione devono adattarsi alle esigenze lavorative e garantire comfort durante tutto il periodo di utilizzo.

I DPI vengono distinti a seconda delle applicazioni:

- **protezione degli arti superiori:** guanti di protezione contro i prodotti chimici e i microrganismi (conformità alla norma EN 374/1/2/3);
- **protezione degli occhi e del viso:** occhiali con o senza schermi laterali, occhiali a visiera o maschere, schermi facciali devono possedere certificazione CE emessa dall'Organismo Notificato per il Produttore che attesti la marcatura CE come DPI per la protezione da spruzzi di liquidi in base ai requisiti previsti dalla norma tecnica EN 166. Nel caso siano disponibili dispositivi per i quali la certificazione di conformità alla suddetta norma tecnica attesti anche la protezione da goccioline (aerosol), questi saranno da preferire come misura di protezione individuale;
- **protezione del corpo:**
 - ✓ protezione locale (grembiuli per schizzi frontali)
 - ✓ copertura limitata da utilizzare nei casi di bassa probabilità di accadimento e per rischi non gravi (es. camici da indossare su altri indumenti ed essere tolti rapidamente in caso di contaminazione)
 - ✓ copertura completa nel caso di protezione totale (es. tute e tute pressurizzate).

I DPI per la protezione del corpo possono essere di **diversa tipologia** in relazione alle modalità lavorative ed alle mansioni da svolgere. Nel caso in cui la valutazione del rischio evidenzi che il rischio di esposizione dell'operatore comporti la necessità di utilizzare altri DPI specifici, gli stessi devono essere compatibili con l'indumento e avere caratteristiche di protezione adeguate.

Le modalità di gestione dopo l'uso dovrebbero essere stabilite con apposite procedure aziendali. Tali procedure devono tenere conto dei livelli di contenimento da realizzare in base agli agenti biologici che rappresentano i rischi di esposizione. Dovrebbero essere stabilite le modalità di conservazione, eventuale decontaminazione o corretto smaltimento. L'utilizzatore deve rispettare le indicazioni di manutenzione stabilite dal fabbricante.

- **protezione delle vie respiratorie**

In relazione alla valutazione del rischio di esposizione, rispetto agli specifici agenti biologici, in base a quanto disposto dal D. Lgs 475/92 (Direttiva 686/89 CE) e dalla Direttiva 54/2000 CE, un facciale filtrante (DPI monouso) necessita di una certificazione CE dall'Organismo Notificato in III categoria.

Flusso del materiale

Negli impianti di contenimento 3 - 4 l'ingresso del materiale può avvenire tramite pass-box.

La manipolazione del materiale deve essere effettuata in modo da evitare o minimizzare i rischi connessi con il suo utilizzo.

Manipolazione dei campioni

Contenitori del campione

I recipienti dei campioni devono essere preferibilmente in plastica e non devono lasciare fuoriuscire il materiale se chiusi correttamente.

I recipienti devono essere etichettati correttamente per facilitarne l'identificazione.

I recipienti devono essere facilmente pulibili anche esternamente.

Trasporto di campioni nell'ambiente di lavoro

I recipienti dei campioni devono essere posti in contenitori rigidi chiusi e mantenuti in posizione verticale per evitare sbandamenti accidentali.

Questi contenitori per il trasporto possono essere di metallo o di plastica, con coperchio preferibilmente dotato di guarnizione, autoclavabili e resistenti all'azione dei disinfettanti chimici, e devono essere decontaminati con regolarità.

Apertura dei contenitori

I contenitori devono essere aperti all'interno di una cappa di sicurezza Classe II.

Particolare attenzione è richiesta nell'apertura di contenitori con materiale liofilizzato, poichè il contenuto può essere sottovuoto e l'ingresso improvviso di aria può favorire la dispersione del materiale nell'atmosfera.

Eliminazione dei rifiuti

Procedure per l'eliminazione dei rifiuti:

Rifiuti solidi

- a) I rifiuti solidi prodotti durante le attività di lavoro devono essere autoclavati prima di essere eliminati come rifiuto speciale. A tal fine devono essere eliminati in sacchetti autoclavabili per rifiuti ospedalieri (sacchetti biohazard). Le fiasche per colture cellulari e le piastre *Petri* devono essere chiuse prima dell'eliminazione, mentre le pipette devono essere inserite in un doppio sacchetto biohazard;
- b) Il sacchetto biohazard deve essere dotato di sistema di rilevazione della corretta sterilizzazione o deve essere chiuso con nastro indicatore, inoltre deve essere riempito per circa 2/3 del volume, in modo tale da permettere l'ingresso del vapore al momento della sterilizzazione (vedi sezione dedicata "autoclave").

Rifiuti liquidi

- a) il materiale liquido deve essere raccolto in contenitori di plastica, in cui è stata aggiunta una quantità di ipoclorito di sodio corrispondente al 20% del volume finale. Quando il volume all'interno del contenitore raggiunge la metà o i due terzi della sua capacità, procedere ad autoclavare il materiale. Assicurarsi che il contenitore sia chiuso con un tappo prima di rimuoverlo dalla cappa;
- b) è raccomandabile usare un contenitore dedicato per trasportare il materiale all'autoclave.

MISURE DI EMERGENZA (UNI EN 12297/2000)

Norme di comportamento in caso di incidente

Per stabilire un piano di intervento in caso di emergenza è necessario rispettare le procedure operative, conoscere i responsabili nei diversi settori (sicurezza, laboratorio, ecc.), ed i recapiti telefonici delle strutture di pronto intervento, ed avere a disposizione materiale di pronto soccorso, abiti di protezione, disinfettanti e attrezzatura per la decontaminazione.

Nel laboratorio di classe 3, oltre che in ogni piano dell'edificio, deve essere presente il kit per le operazioni di pulizia in caso di sversamenti accidentali contenente:

1. panni assorbenti;
2. pinze;
3. contenitori per taglienti;
4. ipoclorito di sodio 5% (candeggina commerciale);
5. guanti grossi da cucina;
6. guanti (vinile/lattice);
7. sovracamice impermeabilizzato;
8. cuffie;
9. occhiali di protezione;
10. mascherina ad alta efficienza FFP3;
11. istruzioni per la pulizia;
12. cartello di divieto d'ingresso per decontaminazione.

AEROSOL

- Evacuare l'ambiente e chiudere le porte;
- avvertire le persone responsabili della sicurezza;
- lasciare l'ambiente chiuso per 30 – 60 minuti per permettere alle particelle di depositarsi;
- segnalare il divieto di entrata nella stanza;
- indossare la tuta protettiva e la maschera appropriata ed entrare nella stanza in due persone;
- sigillare le finestre e i condotti;
- effettuare la disinfezione con formaldeide o altri gas, sigillare la porta, affiggere il cartello di divieto d'ingresso per decontaminazione;
- lasciare agire almeno 24h prima di rimuovere i sigilli e rientrare.

SVERSAMENTO ACCIDENTALE DI MATERIALE INFETTO

Nel caso di sversamento accidentale di materiale infetto seguire le procedure stabilite in modo da minimizzare il rischio di esposizione.

Sversamento di piccole quantità di materiale (<10 ml)

1. Coprire lo sversamento con carta assorbente imbevuta di disinfettante;
2. versare altro disinfettante intorno all'area dello sversamento (il materiale versato dovrà rimanere in contatto con il disinfettante per almeno 20 minuti);
3. autoclavare tutta la carta usata, i guanti ed altro materiale utilizzato per pulire lo sversamento.

Sversamento e/o rottura di provette in area di lavoro

- Indossare indumenti protettivi e i guanti (due paia) nel corso di tutta l'operazione;
- ricoprire, prima di indossare i guanti, eventuali tagli, abrasioni, piccole ferite ecc;
- indossare una maschera facciale;
- usare spazzola e palette per togliere i frammenti di vetro;
- inserire i pezzi di vetro in un contenitore ermetico che a sua volta deve essere inserito in un contenitore per la sterilizzazione;
- utilizzare carta assorbente per rimuovere il materiale e disinfettare la superficie con una soluzione di ipoclorito di sodio al 2,5% o altro tipo di disinfettante;
- aspettare per almeno 30 minuti;
- rimuovere delicatamente la carta assorbente e gli eventuali pezzi di vetro con pinzette;
- sanificare ripetendo l'operazione di asciugatura con carta alternata con disinfettante;
- autoclavare tutti i materiali utilizzati.

Sversamento del materiale all'interno di una centrifuga

- Ispezionare sempre i tubi per verificare la presenza di rotture o fessure prima di centrifugare;
- bilanciare i tubi e posizionarli in modo adeguato, facendo attenzione ad utilizzare l'adattatore idoneo per i tubi specifici e a non riempire mai le provette fino all'orlo;
- fermare subito la centrifuga se la rottura avviene quando essa è in funzione;
- aspettare 15-30 minuti ed aprire lentamente il coperchio indossando una mascherina e guanti monouso (due paia);
- aprire sotto cappa di sicurezza biologica, se possibile, i rotori o i contenitori a tenuta;
- togliere i vetri con delle pinze metalliche e pulire seguendo la procedura precedente.

Sversamento di materiale all'interno di cappe di biologiche di sicurezza

- Mantenere la cappa in funzione, indossare i DPI;
- inserire gli UV e attendere 10-15 minuti;
- assorbire il liquido sversato con carta assorbente;
- aggiungere la sostanza germicida allo sversamento – partendo dall'esterno verso l'interno – per minimizzare la possibilità di aerosol e lasciar agire almeno 20 minuti; rimuovere il disinfettante con una spugna o con carta assorbente. Togliere le griglie e pulirle con della carta imbevuta di disinfettante; procedere quindi alla pulizia del fondo della cappa;
- lavare con disinfettante tutto il piano della cappa, togliere le griglie e pulirle con della carta imbevuta di disinfettante;
- sterilizzare il materiale utilizzato per la pulizia;
- prevedere la disinfezione con formalina della cappa

Sversamento di grosse quantità di materiale (>10 ml)

- Lasciare la stanza per evitare di inalare aerosol, avvertire dell'incidente le altre persone presenti ed il responsabile del laboratorio e chiudere la porta;

- soccorrere il personale esposto: rimuovere gli indumenti contaminati, ed eliminarli. Lavare la cute, se esposta, con del sapone e poi con un antisettico. In caso di schizzi negli occhi procedere al loro lavaggio con l'apposita doccia per 15 minuti. È disponibile inoltre anche doccia completa;
- la persona eventualmente contaminata deve attivare la procedura prevista per incidenti occupazionali rivolgendosi al Servizio di Malattie Infettive.

Procedure di pulizia

- apporre un'indicazione che avverta di non entrare e lasciare che l'eventuale aerosol si depositi per 30 minuti;
- indossare sempre indumenti protettivi (camici rinforzati, guanti, sovrascarpe, cuffie e mascherine FFP3) e raccogliere il materiale per procedere alla decontaminazione (guanti spessi, disinfettante, panni assorbenti, sacchetti biohazard, pinze);
- versare ipoclorito di sodio sulla carta e su altre aree che possano essere state raggiunte dagli schizzi di materiale contaminato. Tutto il materiale accidentalmente versato deve rimanere in contatto con il disinfettante per almeno 20 minuti;
- rimuovere il materiale assorbente, pulire 3 volte con panno imbevuto di ipoclorito di sodio procedendo dall'esterno verso il punto di contaminazione e se si tratta di pareti verticali procedere dall'alto al basso. Effettuare l'ultimo passaggio con panno asciutto. Eventuali frammenti vanno rimossi con pinze e riposti in contenitori per taglienti;
- autoclavare tutto il materiale indossato o usato per pulire il versamento.

INGESTIONE E CONTATTO CON PELLE E OCCHI

- Rimuovere gli indumenti di protezione e chiedere aiuto;
- avvisare immediatamente il medico ed il responsabile per la sicurezza;
- informare sulle modalità di accadimento e fornire appropriata descrizione del materiale con cui si è venuto a contatto;
- lavare abbondantemente con acqua corrente pulita la parte (per la contaminazione degli occhi usare la spruzzetta);
- lavare gli occhi seguendo le istruzioni e senza sfregali;
- recarsi al pronto soccorso.

PUNTURE ACCIDENTALI, TAGLI E ABRASIONI

- Rimuovere gli abiti e i guanti, lavare le mani e le parti coinvolte (facilitare il sanguinamento), applicare un idoneo disinfettante per la pelle;
- informare sulle modalità di accadimento e fornire appropriata descrizione del materiale con il quale si è venuti a contatto;
- avvisare il medico ed il responsabile per la sicurezza.

Approfondimento sulle tecnologie di contenimento

Sommario

Tecnologie di “alto contenimento” devono essere utilizzate per eseguire operazioni con polveri, liquidi e composti biologici estremamente pericolosi. Gli isolatori, anche conosciuti come Glove Box, sono apparecchiature che permettono di eseguire operazioni in un piccolo volume ermeticamente confinato tramite i guanti. Saranno approfonditi alcuni aspetti della tecnologia degli isolatori quali, il sistema di filtrazione dell’aria, i dispositivi di trasferimento dei materiali e i sistemi di bonifica e lavaggio di queste macchine.

L’utilizzo di tali isolatori trova applicazione nell’industria chimica, farmaceutica, nei laboratori di ricerca e sviluppo e in campo ospedaliero e delle forze dell’ordine.

Sostanze in polvere

Una doverosa premessa riguarda il fatto che in tale approfondimento si farà riferimento quasi sempre a sostanze pericolose in polvere, tuttavia gli isolatori, come sopradetto, sono utilizzati ad es. durante la manipolazione di farmaci citotossici (fortemente attivi) per esigenze di salvaguardia dell’operatore e del prodotto, o per impieghi con microrganismi ad alto rischio.

Informazioni su prodotto e processo

Come in tutti i casi in cui si deve affrontare un problema molto complesso, anche nel contenimento di composti “fortemente attivi” occorre procurarsi tutta una serie di informazioni inerenti il prodotto da trattare ed il processo chimico e tecnologico per ottenere il prodotto stesso.

Quanto più dettagliate e precise saranno queste informazioni e tanto più sarà possibile studiare un impianto che soddisfi tutte le esigenze create dalla manipolazione della sostanza pericolosa, e sarà evitato anche il sovradimensionamento di tutto il sistema, dai costi elevati.

I dati importanti riguardano i parametri chimico-fisici del prodotto ed i dati che riguardano la solubilità e l’inattivazione delle sostanze trattate.

Occorre, insomma, una conoscenza dettagliata della lavorazione che si dovrà effettuare per potere individuare quali sono le fasi del processo che rischiano di esporre gli operatori al contatto con le sostanze fortemente attive, siano esse polveri o sostanze biologiche.

Isolatore a pressione negativa

L’isolatore svolge la funzione di protezione del prodotto, dell’ambiente e dell’operatore dagli agenti nocivi grazie ad una serie di barriere “fisiche” che confinano un volume ben definito dal resto dell’ambiente di lavoro. Tali barriere sono costituite da lamiere metalliche o di materiale plastico. L’intervento dell’operatore all’interno del volume confinato è permesso dai guanti installati sulle pareti dell’isolatore e la visibilità è garantita da superfici trasparenti (vetro o materiale plastico).

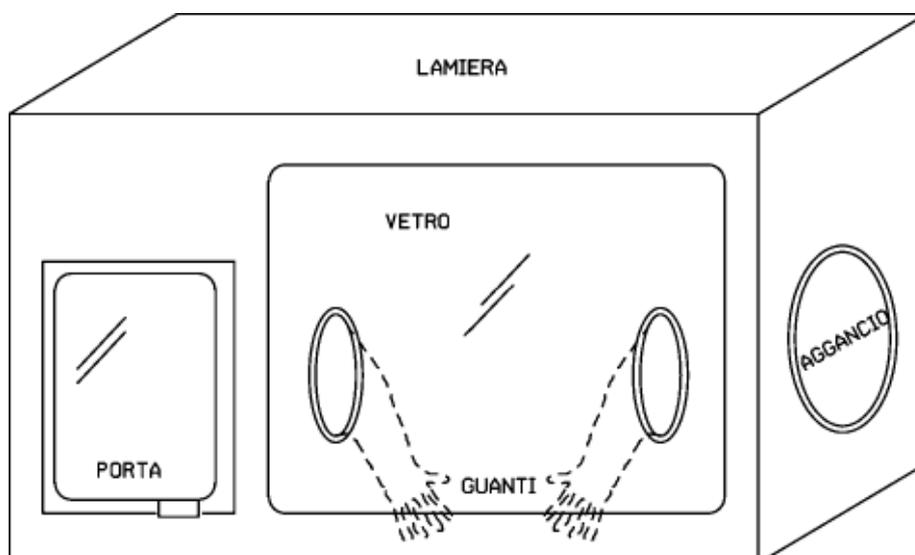


Figura. 21 - Schema di un isolatore



Figura. 22 - Foto di un isolatore

Allo scopo di aumentare ulteriormente la sicurezza offerta dalle barriere fisiche permanenti che confinano la polvere in un volume ben preciso, all'interno dell'isolatore è mantenuta una pressione negativa rispetto all'ambiente esterno. Tale depressione impedisce la fuoriuscita di polvere anche se si verificassero condizioni di funzionamento anomale quali il trafilamento da una guarnizione, la rottura di un guanto o l'apertura accidentale di una porta. In tali condizioni, infatti, grazie alla pressione negativa all'interno dell'isolatore, sarà l'aria esterna ad entrare e non viceversa.

L'isolatore dovrà essere dimensionato in modo da assicurare una sufficiente velocità di ingresso dell'aria dall'esterno verso l'interno dell'isolatore tale da evitare la fuoriuscita di polvere. Nel caso, ad esempio, della rottura di un guanto dovrà essere predisposto un sistema rapido e semplice per la sostituzione dello stesso.

Il sistema di mantenimento della depressione è costituito da uno o più ventilatori che lavorano con l'ausilio di una serie di filtri, di valvole e di strumenti. Si tratta infatti di stabilire pressioni, portate, differenze di pressione (ΔP), sequenze operative, interblocchi, tempi delle varie situazioni di normale processo o di emergenza.

In particolare il sistema di filtrazione dell'aria espulsa deve essere oggetto di particolare attenzione nel caso della sostituzione dei filtri "esausti" in sicurezza, ciò significa fare passare il filtro "sporco" all'interno dell'isolatore in modo da potere sfruttare i sistemi di contenimento e di espulsione di cui questo è dotato.

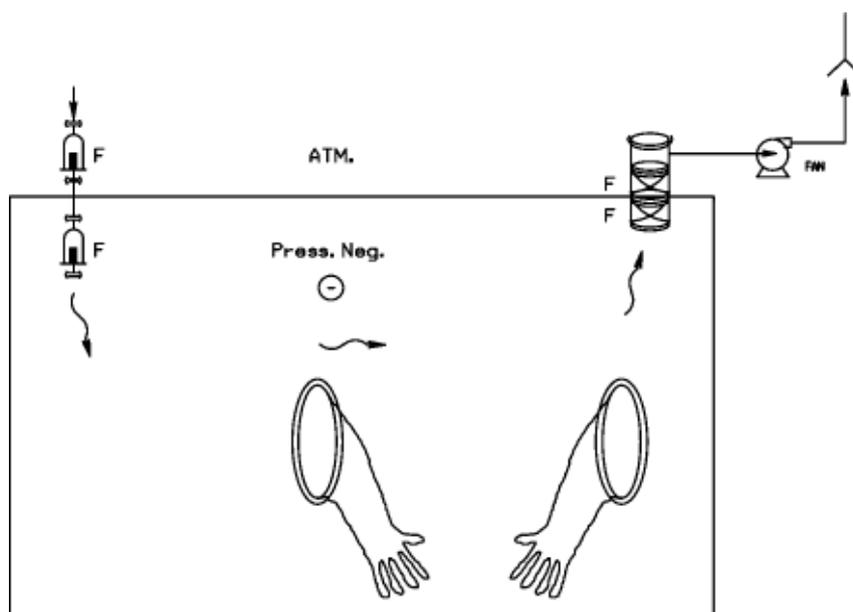


Figura. 23 - Schema semplificato di isolatore a pressione negativa



Figura. 24 - Dettaglio del sistema di filtrazione dell'aria espulsa e del relativo ventilatore che mantiene la depressione in un isolatore

Sistemi di pulizia

Poiché gli isolatori sono utilizzati quando si è in presenza di sostanze fortemente attive (materiale biologico oppure polveri), risulta immediata l'importanza di dotarsi di un adeguato sistema di pulizia dell'interno dell'isolatore dalle sostanze stesse quando questo dovrà essere riaperto.

Sistemi identificati con l'acronimo inglese CIP "Clean In Place", che derivano dall'esperienza in campo farmaceutico nei sistemi di pulizia delle apparecchiature (per evitare "cross-contamination" o per una buona separazione dei lotti), sono stati adattati per la decontaminazione degli isolatori stessi.

Negli isolatori risultano particolarmente adatte le "pistole" spruzzatrici di liquido detergente che viene distribuito sulle superfici alle quantità e caratteristiche richieste, da un sistema di serbatoi, pompe ed eventuali scambiatori. Il sistema CIP può essere dedicato all'isolatore oppure può essere a servizio di tutto il reparto o, comunque, può servire un gruppo di apparecchiature. Di solito questi sistemi hanno piccole dimensioni e sono montati su ruote (Figura. 25).

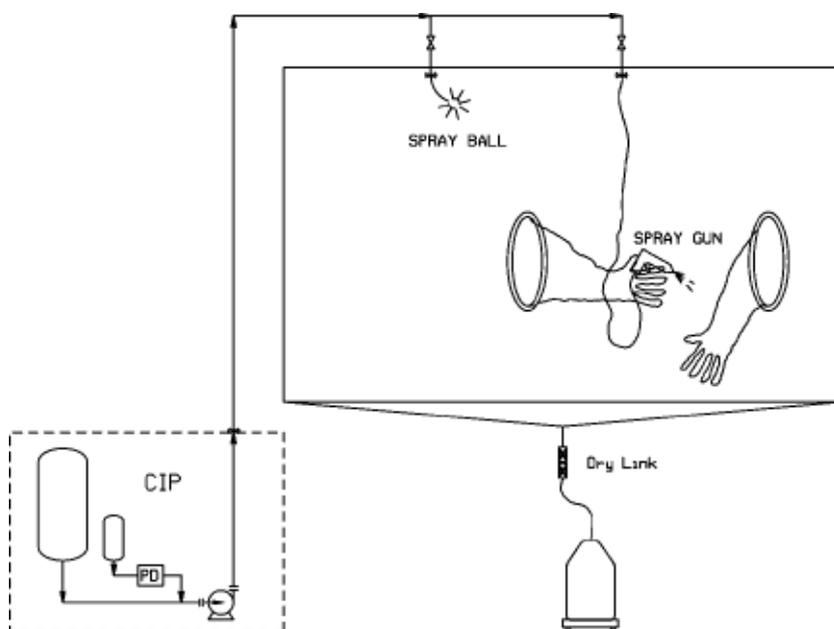


Figura.25 - Rappresenta un CIP asservito ad un isolatore

Lo smaltimento della soluzione esausta del lavaggio avviene come evidenziato in figura 25 attraverso le valvole dry-link che permettono di sganciare il fusto da smaltire senza sversamento della soluzione liquida.

È buona norma fare terminare il ciclo di lavaggio con un risciacquo di acqua a temperatura ambiente (si tratterà del "miglior" tipo di acqua a disposizione, di solito almeno demineralizzata ma sono frequenti i casi in cui si usi acqua Purificata – PW o, addirittura acqua Iniettabile – WFI). Questa precauzione permette di operare con maggiore tranquillità in tutte le operazioni successive al lavaggio.

A tal proposito il costruttore dovrà prestare una particolare attenzione alla facilità di drenaggio delle superfici dell'isolatore

e alla loro finitura superficiale (a specchio).

Altro step richiesto nei casi in cui si debba operare nell'isolatore subito a valle di un lavaggio è l'essiccamento. Tale operazione deve essere condotta con aria a bassissima umidità (quindi deumidificata coi sistemi tipici del condizionamento: raffreddamento, condensazione e separazione delle gocce e post-riscaldamento finale). Nei casi in cui si debba procedere molto velocemente, si utilizza un gruppo di condizionamento dedicato. In casi meno critici, basterà riscaldare l'aria con resistenze elettriche per ottenere un effetto di essiccamento.

In alcuni casi, il semplice lavaggio dell'isolatore può non essere sufficiente e può richiedere l'operazione di sterilizzazione. Tale operazione dovrà essere compatibile con quanto installato all'interno dell'isolatore stesso. L'attuale tecnologia propone sempre più spesso sistemi funzionanti con vapori di acqua ossigenata (spesso indicati con l'acronimo inglese VHP, Vaporized Hydrogen Peroxide). Tali sistemi funzionano con un piccolo sistema di vaporizzazione da una bottiglietta di acqua ossigenata che garantisce una sorta di "nebbia" di vapori di acqua ossigenata stessa in concentrazione letale per i microrganismi. L'intero processo ha la durata di qualche ora e termina con l'abbattimento finale (tramite un catalizzatore) dei vapori di acqua ossigenata al di sotto di valori di sicurezza per gli operatori. Detti sistemi hanno il vantaggio di non danneggiare le eventuali strumentazioni elettroniche presenti all'interno dell'isolatore.



Figure. 26-27 – Alcuni dei più comuni sistemi di generazione, diffusione e successivo abbattimento del VHP

Isolatore a camera unica

L'isolatore a camera unica è il più immediato sistema di contenimento che si possa pensare allo scopo di evitare la diffusione, nell'ambiente di lavoro, di polvere ritenuta pericolosa, tuttavia un sistema a camera unica è utilizzabile solo per quantità di prodotto molto piccole e operazioni che consentono di essere eseguite in un'unica fase.

Una delle condizioni più limitanti, infatti, è che tutti i prodotti, gli eventuali additivi, gli strumenti, i contenitori ed ulteriori accessori siano collocati all'interno dell'isolatore "pulito" prima di cominciare le operazioni.

Una volta completate le operazioni, il prodotto finale deve essere racchiuso all'interno di contenitori facilmente bonificabili, e tutti gli oggetti e le superfici presenti all'interno dell'isolatore devono essere sottoposti a lavaggio.

Inoltre, occorre sottolineare che l'eventuale strumentazione ed i macchinari posti all'interno dell'isolatore devono essere facilmente lavabili e, che non devono essere presenti zone che permettano un ristagno di polvere o di liquido di lavaggio (Figure 28-29).

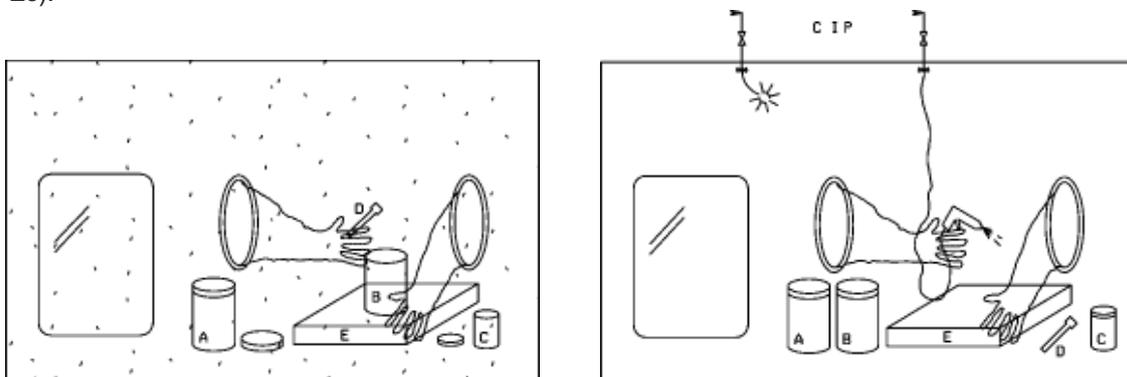


Figure 28-29. - Isolatore a camera singola che richiede la bonifica completa prima della riapertura della porta

Le considerazioni fatte a proposito dell'isolatore a camera singola (bonifica completa e attrezzature lavabili) sembrerebbero limitarne fortemente l'uso se non fosse per alcuni "accessori" che ne consentono un uso un po' più flessibile di seguito illustrati.

Isolatore con pass-box di ingresso

Si intende col termine “pass-box” una camera più piccola, adiacente alla camera principale, con due porte: una verso l'esterno ed un'altra verso la camera principale. Normalmente il pass-box è privo di finestre e di guanti e non è dotato di un sistema di controllo della pressione negativa come la camera principale (Figura. 30).

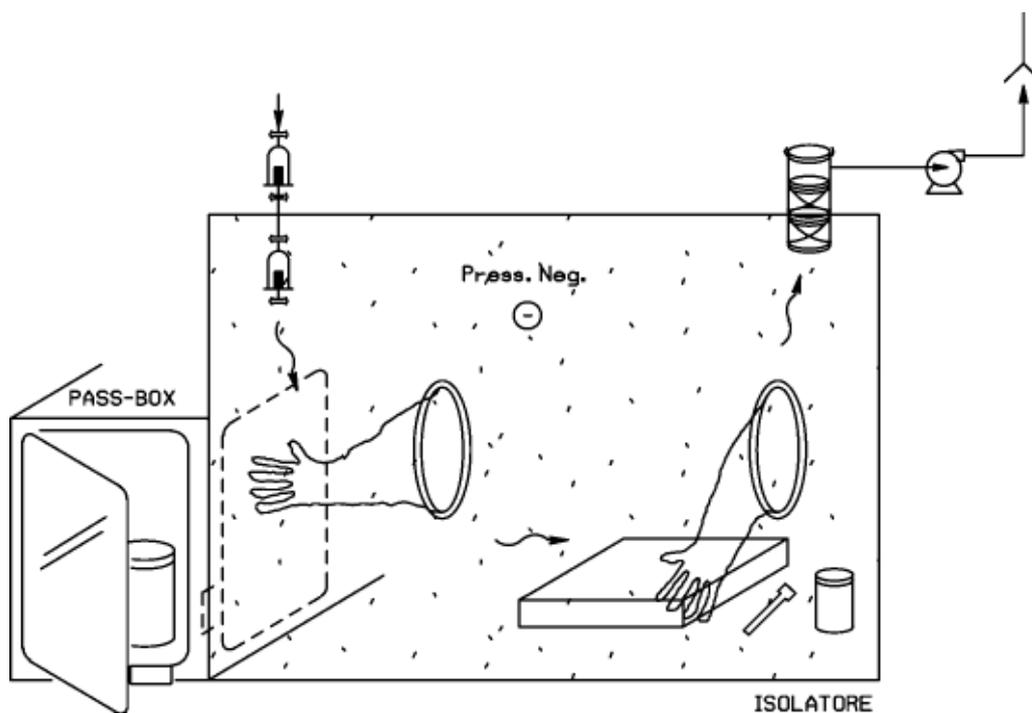


Figura. 30 - Rappresentazione schematica di un isolatore dotato di pass-box

L'introduzione degli oggetti durante le fasi di lavoro avviene tramite le seguenti operazioni in successione: (1) apertura della porta esterna del pass-box e introduzione del materiale; (2) chiusura della porta, l'isolatore dovrebbe essere dotato di un interblocco che impedisca la contemporanea apertura accidentale della porta di comunicazione tra il pass-box e la camera principale; (3) passaggio del materiale da introdurre nella camera principale (Figura. 31) (la pressione negativa presente all'interno della camera principale previene una contaminazione “massiccia” del pass-box). L'operatore nel prelevare il materiale potrebbe accidentalmente contaminare il pass-box.

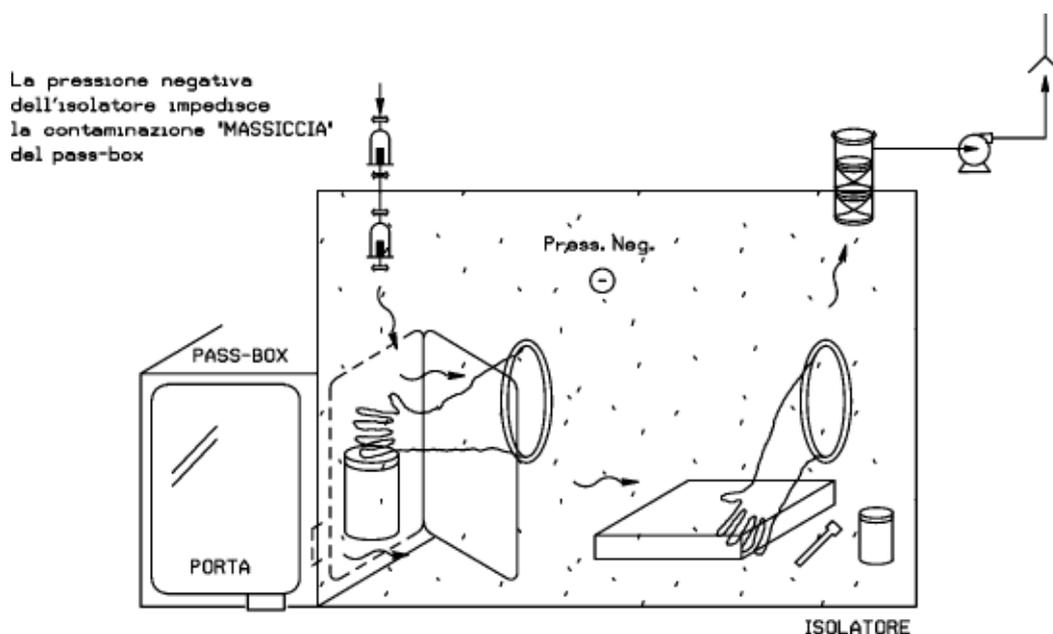


Figura.31 - Introduzione del materiale dal pass-box alla camera principale

Prima di ri-aprire il pass-box (ad esempio per introdurre un secondo oggetto) è opportuno eseguire un ciclo di lavaggio del

volume del pass-box stesso che potrebbe essere contaminato (Figura. 32). Al lavaggio potrà seguire un essiccamento a pass-box chiuso solo se ciò è ritenuto strettamente necessario, altrimenti esso potrà essere asciugato aprendo la porta esterna senza correre alcun rischio.

Tuttavia, prima di riaprire il pass-box e' bene lavarlo.
Lavaggio che risulta molto semplice perche' NON
ci sono oggetti contenuti nel pass-box

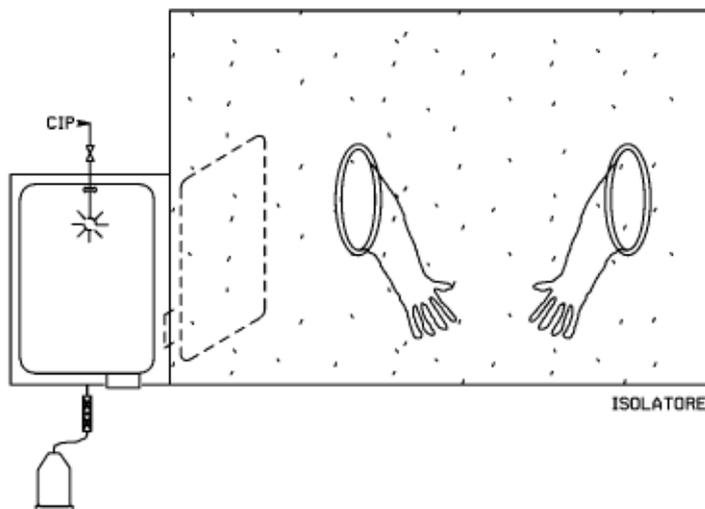


Figura. 32 - Lavaggio del pass-box

Una considerazione sull'utilizzo del pass-box riguarda la possibilità di utilizzarlo anche per fare uscire oggetti o contenitori che debbono poi essere riutilizzati.

Tale utilizzo risulterebbe pericoloso e assolutamente sconsigliabile. Infatti non essendo il pass-box dotato né di guanti né di finestre, è difficile (o impossibile) garantire la pulizia completa degli oggetti e delle pareti del pass-box stesso. Si pensi, ad esempio, alle zone di appoggio degli oggetti o alle aree delle pareti del pass-box che non riescono ad essere irrorate dal liquido di lavaggio a causa della presenza degli oggetti stessi.

Film tubolare per smaltimento

Utile accessorio dell'isolatore è il sistema di espulsione di oggetti da smaltire, attraverso l'uso di film tubolare in plastica termosaldabile. Lo smaltimento può interessare contenitori vuoti (ma contaminati) che hanno già esaurito la loro funzione, oppure attrezzi usa e getta o altri accessori, piccole quantità di prodotto non utilizzabile.

In Figura. 33 vengono rappresentate le varie fasi di questa operazione:

- aprire dall'interno la porta che divide la camera principale dal vano cilindrico annesso alla camera dell'isolatore e inserire l'oggetto da smaltire, dopo aver controllato che il film tubolare esterno sia presente e saldato (Figura. 33 A).
- procedere alla saldatura della porzione di film tubolare in plastica di dimensioni sufficienti a contenere gli oggetti da avviare allo smaltimento.
- tagliare (di solito con l'ausilio della macchina termosaldatrice stessa) la sacca contenente all'interno gli oggetti da smaltire (Figura. 33 B).

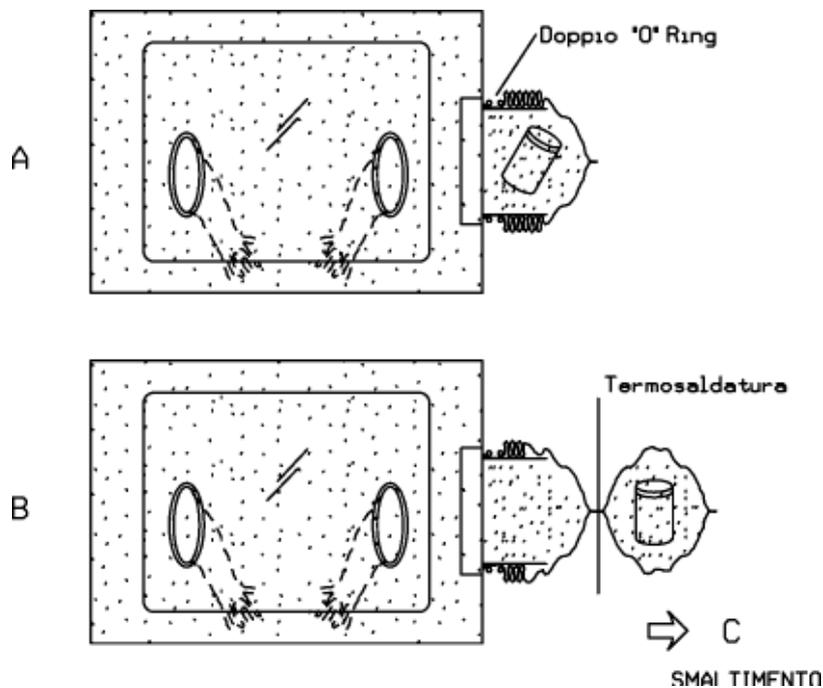


Figura. 33 A e B - Fasi relative allo smaltimento con film tubolare



Figura. 34 - Foto di un sistema reale

I sistemi di espulsione sono dotati di una successione di scanalature e anelli di tenuta che permettono la facile e sicura sostituzione del film continuo tubolare con uno nuovo quando si arriva al termine del tubolare vecchio.

In casi eccezionali il sistema a film continuo tubolare termosaldabile può servire anche per il trasferimento di oggetti che debbano poi essere riutilizzati altrove a patto che si proceda all'apertura del sacchetto all'interno della camera di un isolatore. Esistono sistemi più idonei per il trasferimento di materiali da un isolatore ad un altro di seguito illustrati.

Contenitori RTP

Con il termine "contenitori RTP" si intende una particolare categoria di contenitori che possono essere agganciati in modo rapido e sicuro alle pareti di un isolatore mediante una porta speciale denominata RTP (Rapid Transfer Port).

Tale sistema di aggancio è descritto nel Cap. 7 della norma ISO 11933-3 ove si indicano i principi fondamentali di questo tipo di aggancio (per i dettagli si rimanda alla suddetta fonte).

Nella Figura. 35 è rappresentata una semplificazione del funzionamento del contenitore RTP che consente di trasferire oggetti mediante l'accoppiamento del contenitore all'isolatore, attraverso l'apertura dall'interno della parte circolare della RTP, e il disaccoppiamento del contenitore dall'isolatore a fine operazione.

La speciale lavorazione meccanica delle due porte RTP (quella sull'isolatore e quella sul contenitore), garantisce un intimo

contatto tra le superfici (“2” e “4”, Figura. 35 A) che, una volta disaccoppiate le RTP, si verranno a trovare sulla parte esterna dell’isolatore e sulla parte esterna del contenitore, quindi, affacciate all’ambiente di lavoro. In Figura 35 B queste superfici sono indicate con la parola “PULITO” proprio per sottolineare il concetto di funzionamento della porta RTP.

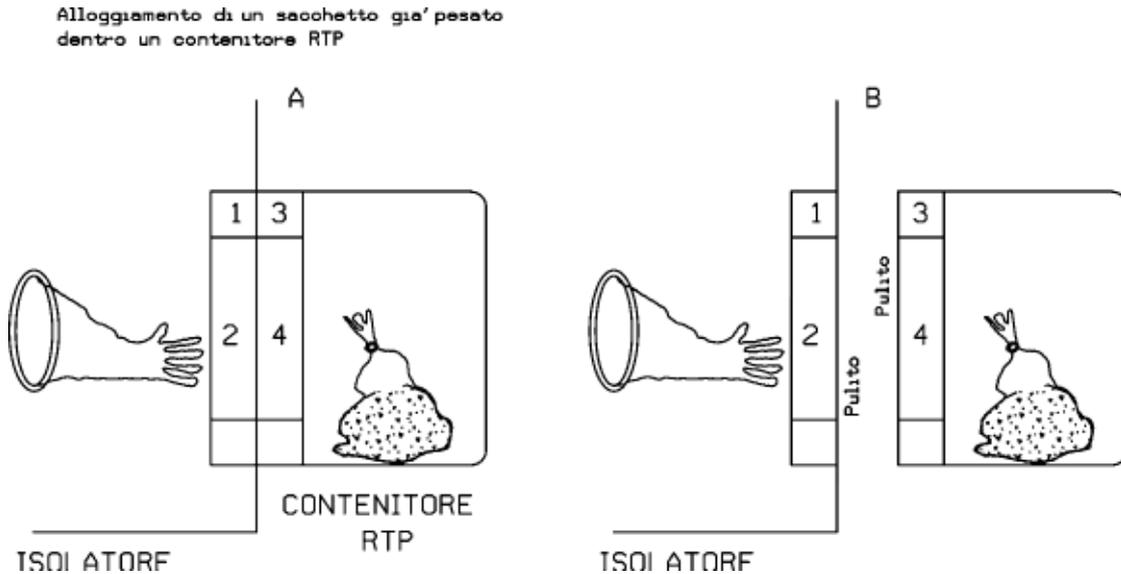


Figura. 35 A e B - Funzionamento del contenitore RTP

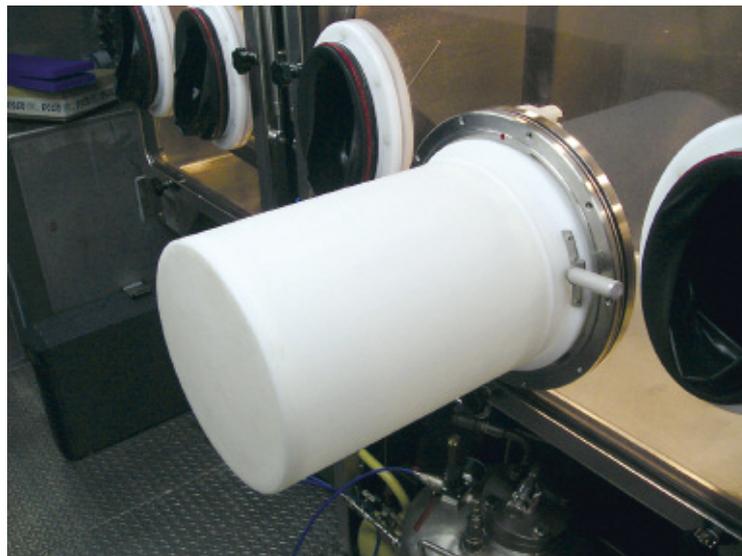


Figura. 36 - Foto di un contenitore RTP agganciato sulla parete di un isolatore

Una volta trasferito il prodotto all’interno del contenitore RTP, è possibile agganciarlo ad un altro isolatore e trasferirlo in piena sicurezza (e rapidità).

I contenitori RTP sono abbastanza diffusi e consentono lo scambio di prodotti anche tra aziende o enti diversi che si trovano in località distanti tra di loro.

Isolatore a doppia camera

Un modo per superare le rigidità operative che impone un isolatore a camera singola, anche se in parte attenuate dagli accessori sopra descritti, è quello di dotare il proprio impianto di un isolatore a doppia camera.

In questo tipo di isolatore (Figure. 37-38) accanto alla camera principale, e collegata ad essa per mezzo di una porta, viene installata una vera e propria “camera di servizio” o “precamera” dotata anch’essa di finestra, guanti, sistema di lavaggio e di ventilazione.

La funzione di questa precamera (a sinistra in Figura. 37) è importantissima poiché consente un più facile passaggio (con relativa bonifica) degli oggetti da fare entrare o da fare uscire dalla camera principale consentendo il lavaggio dei soli oggetti interessati al “transito”.

Per tale motivo è importante che la precamera sia di dimensioni appena sufficienti ad ospitare gli oggetti “in transito” da e

per la camera principale. È opportuno che nella precamera siano installati un paio di guanti per facilitare le operazioni di lavaggio con pistola a spruzzo.

La precamera deve essere concepita solo come un luogo dove è consentito il passaggio ed il lavaggio degli oggetti (contenitori, strumenti, attrezzi, accessori.....) che vanno e vengono dalla camera principale nella quale, invece, è presente tutto ciò che occorre alle operazioni di processo.

La presenza della precamera, comunque, non toglie la possibilità di installare nella camera principale tutti quegli accessori che sono stati precedentemente descritti, ad esempio, il sistema di espulsione a film continuo o gli agganci RTP per i contenitori.

Il sistema camera-precamera sarà anche dotato di una serie di interblocchi che regola l'apertura delle porte e previene l'apertura accidentale di una di esse. Inoltre i due sistemi di ventilazione, seppur indipendenti, dovranno essere coordinati da un unico computer che mantenga le pressioni (entrambe negative rispetto all'ambiente di lavoro) ai valori progettati durante tutte le varie fasi della lavorazione.

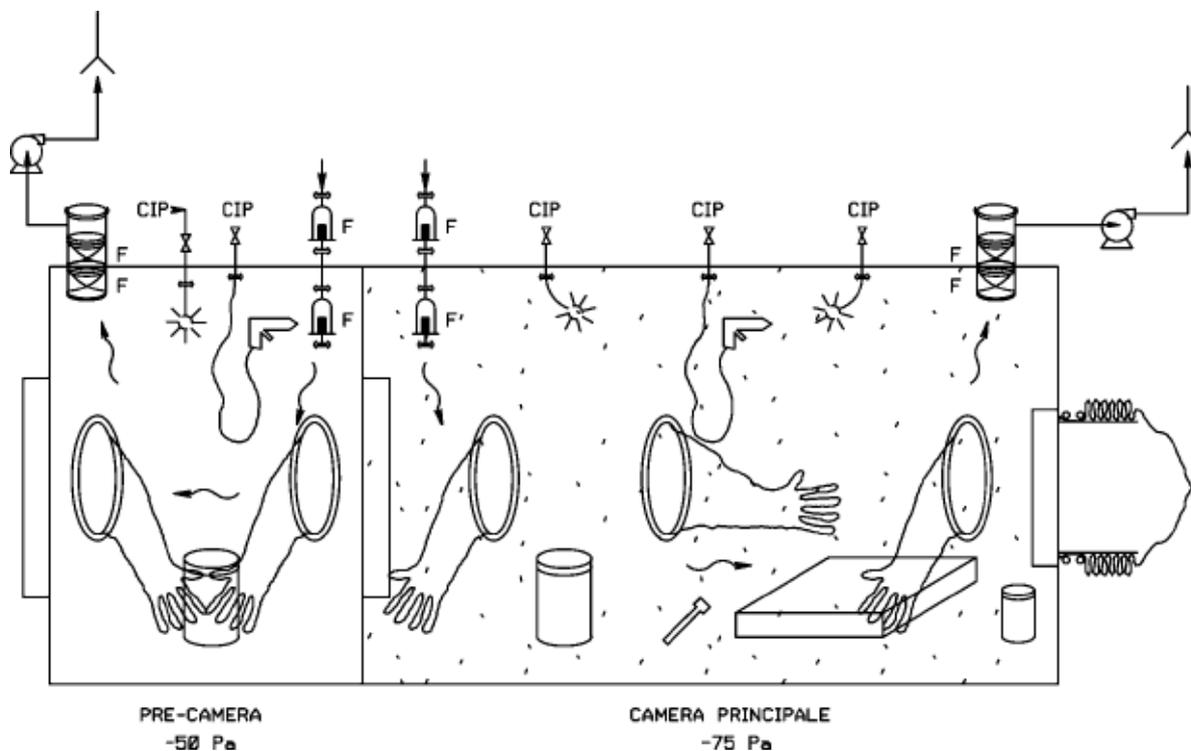


Figura. 37 - Rappresentazione schematica di un isolatore a doppia camera



Figura. 38 - Foto di isolatore a doppia camera

La normativa nel campo degli isolatori

1. Sommario

Gli isolatori, sono apparecchiature, molto costose, che servono per creare un piccolo volume rigorosamente confinato entro il quale eseguire operazioni con polveri, liquidi e composti biologici estremamente pericolosi. Si tratta, quindi, di una misura di protezione dell'ambiente di lavoro nei confronti di inalazione o contatto con sostanze fortemente tossiche. Si esamineranno le principali normative di legge, italiane (D. Lgs 81/08, ecc...) ed europee, evidenziando che tali apparecchiature rispettano, tra gli altri, il principio di preferenza di misure di protezione collettiva rispetto ai dispositivi di protezione individuale. Verranno presi in considerazione anche i riferimenti che la "Direttiva Macchine" riserva a questo tipo di apparecchiature. Si citeranno anche le principali normative tecniche (ISO-EN-UNI) che si occupano degli isolatori.



2. Riferimenti legislativi – Nuovo approccio del Legislatore

Si elencheranno e commenteranno alcuni riferimenti legislativi, sia italiani che europei, che indicano chiaramente che, in presenza di molecole "fortemente attive" o microrganismi, l'uso degli isolatori è perfettamente rispondente alla normativa vigente.

I riferimenti di leggi italiane citati testualmente saranno in corsivo. Per quanto riguarda la legislazione comunitaria si è utilizzata la versione in inglese (anch'essa in corsivo).

Innanzitutto occorre ricordare che da oltre venti anni le Direttive si muovono nel solco del cosiddetto "Nuovo Approccio" ("*new approach*" Resolution -7 May 1985) che tende ad evitare di imporre dettagliate soluzioni tecniche nelle norme di legge. Infatti, nel corso di molti anni di esperienza (le prime leggi "tecniche" risalgono agli anni '20) si è visto che l'evoluzione tecnologica corre molto più velocemente delle norme di legge. Questo fenomeno, notevolmente accentuato in questi anni, fa sì che se si decidesse di "fissare" soluzioni tecniche "per legge", si finirebbe inevitabilmente per impedire l'adozione di nuove e più efficaci misure di sicurezza che l'evoluzione della tecnologia propone e che la normativa (nel frattempo rimasta "indietro") invece nega (o non prevede). Si finirebbe così per creare un danno al livello di sicurezza generale.

Un esempio per tutti: i misuratori "a visione diretta" del livello dell'acqua a vetro nei generatori di vapore che, in virtù di leggi degli anni '30, sono stati prescritti fino a tempi recenti quando la tecnologia, nel frattempo, aveva già elaborato soluzioni più moderne ed efficaci (livelli capacitivi, oppure radar, o a fibre ottiche ...).

Per citare solo le più importanti, ad esempio, la Direttiva Macchine (DPR 459/96), di cui si approfondiranno in seguito diversi punti, dedica tutto l'Allegato I alla definizione dei **requisiti essenziali di sicurezza** e costituisce una utile guida.

Altrettanto importante è l'Allegato I della cosiddetta Direttiva PED (dall'acronimo inglese Pressure Equipment Directive, recepita in Italia col D. Lgs n. 93 del 25/2/2000) che orienta il progettista per quanto riguarda le apparecchiature in pressione. Un'altra recente direttiva che applica lo stesso concetto relativamente ai **requisiti essenziali di sicurezza** è la cosiddetta ATEX (dall'acronimo inglese Atmosphere Explosive, recepita in Italia col D. Lgs n. 126 del 23/3/1998), in questo caso, però, i requisiti essenziali di sicurezza vengono espone nell'Allegato II.

Tutte queste ultime Direttive si rifanno ad un concetto fondamentale (che era già in embrione nella Legge italiana n. 186 del 1/3/1968), e cioè il fatto che un'apparecchiatura o un impianto che venga progettato, costruito ed esercito seguendo una norma tecnica armonizzata (EN) o, quantomeno, nazionale (UNI o CEI) si considera automaticamente rispondente ai principi di "buona tecnica" richiesti dalla legge. Si conferisce, così, una notevole importanza alle norme tecniche (UNI-EN) senza costringere il legislatore ad entrare in dettagli ingegneristici e costruttivi durante la stesura delle leggi correndo, inoltre, il rischio di "cristallizzare" la tecnologia al momento della stesura della legge.

Un altro aspetto importante in questa introduzione, consiste nel ricordare i continui richiami della normativa di legge all'obbligo di mettere in pratica tutte le misure possibili per favorire la salute e la sicurezza dei lavoratori e della popolazione. Si trovano, infatti, frequenti citazioni ai concetti di "utilizzo della migliore tecnologia disponibile" ed al "contenimento del pericolo alla fonte".

A seguito di questo nuovo atteggiamento del Legislatore, quindi, i progettisti ed i gestori degli impianti si trovano di fronte a scelte difficili: da una parte hanno indicazioni meno dettagliate che provengono dalla normativa, dall'altra si trovano richieste molto pressanti a favore della sicurezza del lavoro.

Le tecnologie che sono illustrate rispondono ai requisiti di "buona tecnica" richiesti dalla legge. Si tratta di contenere la polvere pericolosa all'interno di un volume che è normalmente il più piccolo possibile ed è sempre "costruito" attorno alla fonte di emissione della polvere stessa. Inoltre l'isolatore costituisce una vera e propria barriera fisica che si interpone tra l'operatore ed il pericolo e costituisce fino ad oggi la migliore tecnologia per agenti biologici pericolosi o per raggiungere valori bassissimi di concentrazione di polvere fortemente attiva nell'ambiente di lavoro.

3. Riferimenti legislativi – Principi Generali

Sebbene la legislazione italiana in materia di sicurezza risalga agli anni '20 con consistenti capitoli aggiunti anche negli anni '50 (DPR 547/55) si inizieranno le citazioni con la Direttiva Europea 89/391/EEC che ha dato vita, col suo recepimento italiano, al Decreto Legislativo 81/08 detto comunemente "Testo Unico sulla sicurezza". Si riportano alcuni punti ritenuti significativi per l'argomento Isolatori.

Council Directive 89/391/EEC - 12 June 1989 - introduction of measures to encourage improvements in the safety and health of workers at work

.....

article 6 (general obligations on employers)

par. 2 (...general principles of prevention)

.....

c) combating the risk **at source**

.....

e) adapting to **technical progress**

.....

h) giving **collective protective measures** priority over individual protective measures

.....

article 6 (general obligations on employers)

par. 3 (...the employer shall)

a) **evaluate the risk** to the safety and health of workers, inter alia in the choice of work equipment, the chemical substances or preparation used, and the fitting-out of work places

.....

assure an **improvement** in the level of protection afforded to workers with regards to safety and health

La trasposizione in legge italiana è, in questo caso, quasi testuale:

D. Lgs. 81/08

.....

art. 15 (misure generali di tutela)

a) **valutazione di tutti i rischi** per la salute e la sicurezza

c) **eliminazione dei rischi** e, ove ciò non è possibile, loro riduzione al minimo in relazione alle conoscenze acquisite in base al **progresso tecnico**;

d) **rispetto dei principi ergonomici** nell'organizzazione del lavoro, nella concezione dei posti di lavoro, nella scelta delle attrezzature e nella definizione dei metodi di lavoro e produzione

e) **riduzione dei rischi alla fonte**;

i) **priorità delle misure di protezione collettiva** rispetto alle misure di protezione individuale;

Art. 18 Obblighi del Datore di Lavoro e del Dirigente

z) **aggiornare** le misure di prevenzione in relazione ai mutamenti organizzativi e produttivi che hanno rilevanza ai fini della salute e della sicurezza del lavoro, o in relazione al grado di **evoluzione della tecnica**, della prevenzione e della protezione;

Art. 28. – Oggetto della valutazione dei rischi.

1. La valutazione ... (dei rischi), anche nella **scelta delle attrezzature di lavoro** e delle sostanze o dei preparati chimici impiegati, nonché nella sistemazione dei luoghi di lavoro deve riguardare tutti i rischi per la sicurezza e per la salute dei lavoratori, ivi compresi quelli riguardanti gruppi di lavoratori esposti a **rischi particolari**.

Come si è potuto vedere, a monte di tutte le considerazioni vi è una doverosa **Valutazione dei Rischi**. Argomento, questo, di igiene industriale molto complesso che non verrà sviluppato in questa sede. Evidentemente le tecnologie di "alto contenimento" sono applicabili nei casi (oggi sempre più frequenti) di molecole "fortemente attive" come succede, ad esempio, nel caso dei farmaci citotossici. Un altro caso che si può citare sono le applicazioni in ambito di Ricerca e Sviluppo (sia chimico che biologico) in cui quello che si sta manipolando può essere potenzialmente pericoloso.

Dai precedenti brevi estratti dalle norme di legge, appare chiaro come gli isolatori (e le altre apparecchiature di "alto contenimento") rispettino in pieno le richieste di:

- contenimento del rischio "alla fonte", l'isolatore confina un volume protetto attorno alla sorgente di agente pericoloso;
- rispetto dei principi ergonomici, poiché evita agli operatori di indossare pesanti scafandri;
- adeguamento alle moderne tecnologie, trattandosi di quanto di più avanzato esista in campo tecnologico.

Ulteriori successive citazioni (più inerenti alle attrezzature di lavoro) rafforzano e confermano i concetti sopra esposti.

Council Directive 89/655/EEC - 30 Nov 1989

minimum safety and health requirements for the use of **work equipment** by workers at work

Annex
par. 2.5.

....

Work equipment presenting hazard due to emissions of gas, vapour, liquid **or dust** must be fitted with appropriate **containment** and/or extraction devices **near the source** of the hazard



Figura. 39

4. Riferimenti legislativi - Agenti Cancerogeni

Council Directive 90/394/EEC - 28 June 1990 - Protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens at work

Article 5 (prevention and reduction of exposure)

par. 2. the employer shall ensure that the carcinogen is, in so far as is **technically possible**, manufactured and used in a **closed system**

...

par. 4. whenever a carcinogen is used, the employer shall apply all the following measures:

(c) design of work processes and engineering control measures so as **to avoid or minimize** the **release** of carcinogens into the place of work

(g) **collective protection measures** and/or, where exposure cannot be avoided by other means, individual protection measures

5. Riferimenti legislativi – Agenti Chimici

Council Directive 98/24/EC - 7 April 1998 - Protection of the health and safety of workers from the risks related to chemical agents at work

Article 5 (general principles for prevention of risks associated with hazardous chemical agents...)

par. 2. Risks shall be eliminated or reduced to a minimum by:
the design and organisation of **systems of work** at the workplace

....

reducing to a minimum the duration and **intensity of exposure**

Suitable working procedure including arrangements for **the safe handling**....

81/08 TITOLO IX capo I (agenti chimici)

.....

Art. 225 Misure specifiche di protezione e di prevenzione.

1..... il datore di lavoro garantisce che il rischio sia ridotto mediante l'applicazione delle seguenti misure da adottarsi nel seguente ordine di priorità:

a) progettazione di appropriati processi lavorativi e controlli tecnici, nonché uso di **attrezzature e materiali adeguati**

b) appropriate misure organizzative e di **protezione collettive alla fonte del rischio**

c) misure di protezione individuali, compresi i dispositivi di protezione individuali, **qualora non si riesca a prevenire con altri mezzi** l'esposizione

6. Riferimenti legislativi – Agenti Biologici

Directive 2000/54/EC – 18/09/2000 - Protection of workers from the risks related to exposure to biological agents at work

.....
Article 6 (reduction of risks)
paragraph 2.

(b) design of work processes and engineering control measures so as to **avoid or minimize the release** of biological agents into the place of work

(c) **collective protection measures** and/or, where exposure cannot be avoided by other means, individual protection measures

(d) hygiene measures compatible with the aim of the prevention or reduction of the accidental **transfer or release** of a biological agent from the workplace

81/08 TITOLO X (agenti biologici)

.....
Art. 272. - Misure tecniche, organizzative, procedurali.

1. In tutte le attività per le quali la valutazione ... (dei rischi)... evidenzia rischi per la salute dei lavoratori il datore di lavoro attua **misure tecniche**, organizzative e procedurali, per **evitare ogni esposizione** degli stessi ad agenti biologici.

2. In particolare, il datore di lavoro:

a) evita l'utilizzazione di agenti biologici nocivi, se il tipo di attività lavorativa lo consente;

b) limita al minimo i lavoratori esposti, o potenzialmente esposti, al rischio di agenti biologici;

c) **progetta adeguatamente i processi lavorativi**;

d) adotta **misure collettive di protezione** ovvero misure di protezione individuali qualora on sia possibile evitare altrimenti l'esposizione;

e) adotta misure igieniche per prevenire e ridurre al minimo la **propagazione** accidentale di un agente biologico fuori dal luogo di lavoro;

.....
m) concorda procedure per la **manipolazione ed il trasporto** in condizioni di sicurezza di agenti biologici all'interno del luogo di lavoro.

7. Riferimenti legislativi – Macchine

Directive 2006/42/EC (Machinery, amending Directive 95/16/EC)

Art. 7 (Presumption of Conformity)

Machinery manufactured in conformity with a harmonized standard, the references to which have been published in the Official Journal of the European Union, shall be presumed to comply with the essential Health and Safety requirements covered by such a harmonized standard

Si riporta, qui sotto, il suo quasi testuale recepimento:

Direttiva Macchine (DPR 459/96)

Art. 2. Conformità ai requisiti essenziali di sicurezza

comma 1. Possono essere immessi sul mercato o messi in servizio le macchine ed i componenti di sicurezza conformi alle disposizioni del presente regolamento ed ai requisiti essenziali di cui all'Allegato I (RES)

.....
comma 3. Si presumono rispondenti ai requisiti essenziali di cui al comma 1 le macchine ed i componenti di sicurezza costruiti in conformità alle norme armonizzate

Di seguito si citano alcuni punti dell'Allegato I (Requisiti Essenziali di Sicurezza) che occorre, comunque soddisfare qualora non si trovino norme armonizzate strettamente pertinenti alla situazione tecnica che si deve risolvere.

È stata omessa la versione originale inglese in alcuni punti nei quali il recepimento non è stato altro che una traduzione molto fedele in italiano.

Directive 2006/42/EC (Machinery, amending Directive 95/16/EC)

Annex I

Essential Health and Safety Requirements relating to the design and construction of machinery

1.1.2. Principles of safety integration

a) machinery must be designed and constructed so that it is fitted for its function, and can be operated, adjusted and maintained, without putting persons at risk.....

b) in selecting the most appropriate methods, the manufacturer.....must apply the following principles, in the order given:

- eliminate or reduce risks as far as possible (inherently safe machinery design and construction)
- take the necessary protective measures in relation to risks that cannot be eliminated
- inform users of residual risks

.....
1.1.6. Ergonomics

Under the intended conditions of use, the discomfort, fatigue and physical and psychological stress faced by the operator

must be reduced to the minimum possible taking into account ergonomic principles.....

Direttiva Macchine (DPR 459/96)

Allegato I (requisiti Essenziali di Sicurezza)

1.1.2 Principi d'integrazione della sicurezza

a) Per costruzione, le macchine devono essere atte a **funzionare**, ad essere regolate e a subire la **manutenzione** senza che tali operazioni, se effettuate nelle condizioni previste dal fabbricante, esponano a rischi le persone. Le misure adottate devono avere lo scopo di eliminare il rischio di infortuni durante l'esistenza prevedibile della macchina, comprese le fasi **di montaggio e smontaggio** anche se tale rischio fosse la conseguenza di una situazione anormale prevedibile.

b) Per la scelta delle soluzioni più opportune il fabbricante **deve** applicare i seguenti principi, **nell'ordine indicato**:

- eliminare o ridurre i rischi nel miglior modo possibile (integrazione della sicurezza nella progettazione e nella costruzione della macchina);
- adottare le misure di protezione necessarie nei confronti dei rischi che non possono essere eliminati;
- informare gli utilizzatori dei rischi residui

d) Nelle condizioni d'uso previste devono essere ridotti al minimo possibile il disagio, la fatica e le tensioni psichiche (stress) dell'operatore, tenuto conto dei principi dell'**ergonomia**.

Ergonomia



Figura. 40

Prevenzione dei rischi dovuti agli elementi mobili

Si riporta solamente un esempio di un isolatore nel quale, al suo interno, è presente un piccolo mulino (rompigrumi). In questo caso sono state installate delle fotocellule per impedire il funzionamento del mulino stesso quando l'operatore ha le braccia infilate nei guanti (Figura. 42).

Machinery Directive 2006/42/EC Annex I
1.3.7. Risks related to moving parts

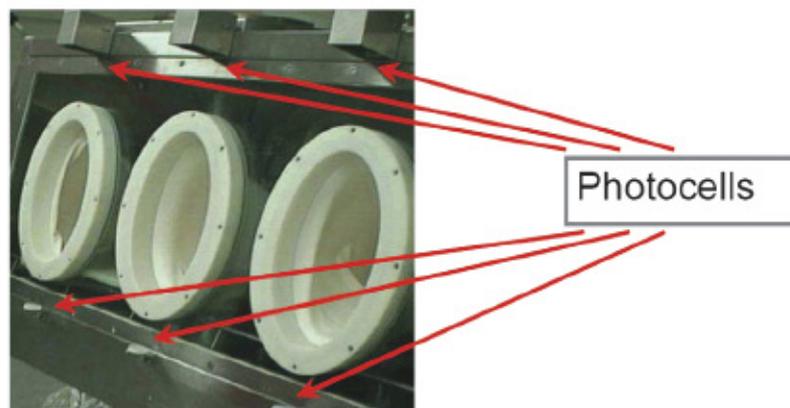


Figura. 41

Rischi di esplosione

La macchina deve essere progettata e costruita in modo da evitare qualsiasi rischio di esplosione provocato dalla macchina stessa o da gas, liquidi, polveri, vapori ed altre sostanze prodotti utilizzati dalla macchina.

In questa situazione si fa notare come sia relativamente facile lussare l'isolatore con azoto invece che con aria qualora si manipoli una polvere potenzialmente esplosiva (lo sono quasi tutti i composti farmaceutici) o ancora contenente un solvente infiammabile oppure, semplicemente, della quale non si conoscano i parametri di esplosività (situazione molto frequente).

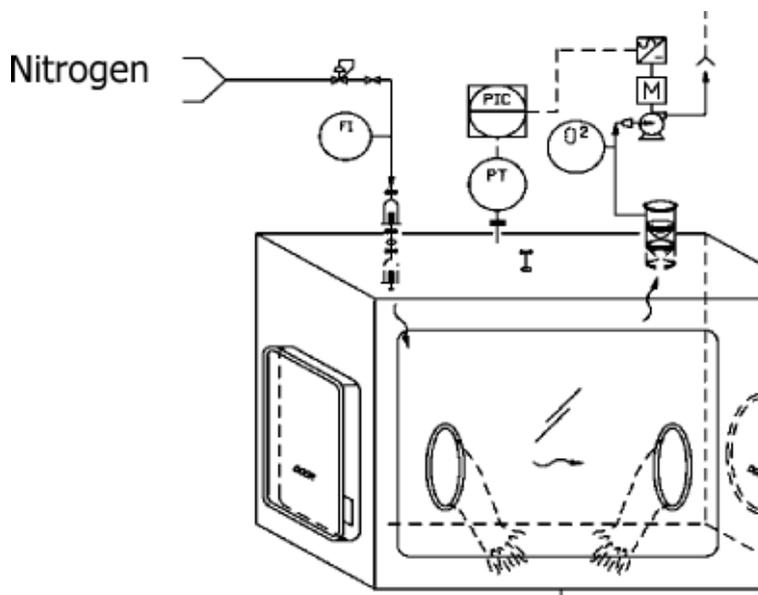


Figura. 42

Rischi dovuti alla emissione di polvere, gas, ecc.

La macchina deve essere progettata, costruita e/o equipaggiata in modo tale da evitare i rischi dovuti a gas, liquidi, polveri, vapori ed altri residui prodotti.

Punto, questo, che sintetizza tutto il concetto dell'isolatore che è costruito proprio attorno al punto di emissione.

Pulitura delle parti interne

La macchina deve essere progettata e costruita in modo che la pulizia delle parti interne della macchina che ha contenuto sostanze o preparazioni pericolose sia possibile senza penetrare in tali parti interne; lo stesso dicasi per l'eventuale svuotamento completo che deve poter essere fatto all'esterno.



Figura. 43

Istruzioni per l'uso

a) Ogni macchina deve essere accompagnata da un'istruzione per l'uso che fornisca almeno le seguenti informazioni:

.....

.....le condizioni di utilizzazione previste.....

le istruzioni per eseguire senza alcun rischio: ...la messa in funzione; l'utilizzazione; il trasporto; l'installazione; il montaggio e lo smontaggio; la regolazione; la manutenzione e la riparazione....

2.1. Foodstuff machinery and machinery for cosmetics or pharmaceutical product

.....

all surfacesmust:

be smooth and have neither ridges nor crevices...

Be designed and constructed in such a way as to reduce the projections, edges and recesses..

Be easily cleaned and disinfected, ...

2.1 Macchine agroalimentari

.....

b) Tutte le superfici e gli elementi di raccordo devono essere lisci, senza rugosità ne' spazi in cui possono fermarsi materie organiche.

c) I gruppi costituiti da più unità devono essere progettati in modo da ridurre al minimo le sporgenze, i bordi e gli angoli. Essi sono realizzati preferibilmente mediante saldatura o incollatura continua.

d) Tutte le superfici a contatto con i prodotti alimentari devono poter essere facilmente pulite e disinfettate eventualmente dopo aver tolto le parti facilmente smontabili. Gli angoli interni devono essere raccordati con raggi tali da consentire una pulizia completa.

e) I liquidi provenienti da prodotti alimentari e i prodotti di pulizia, di disinfezione e di risciacquatura devono poter defluire verso l'esterno della macchina senza incontrare ostacoli (eventualmente in una posizione "pulizia").

8. Normativa tecnica e pubblicazioni

Nell'introduzione del presente capitolo, si è visto che, a seguito del nuovo atteggiamento del Legislatore, le Norme Tecniche hanno assunto sempre maggiore importanza e dignità. Esse, pur non essendo strettamente obbligatorie, semplificano notevolmente il lavoro dei progettisti e dei gestori di macchine ed impianti. Grazie, infatti, alla "**presunzione di conformità**" è sufficiente indicare di avere seguito una Norma Tecnica "accreditata" per evitare di dovere dimostrare di avere seguito punto per punto i Requisiti Essenziali di Sicurezza (RES).

Si elencano qui di seguito, con brevi commenti, le norme tecniche inerenti la materia emesse da organismi normatori pubblici europei od internazionali. Si elencheranno, infine, alcune pubblicazioni relative agli isolatori.

L'importanza della normativa tecnica è richiamata più volte nella legislazione e viene indicata come una guida da seguire per essere sicuri di ottemperare i requisiti di "buona tecnica" e "conformità" pretesi dalla legislazione stessa. In pratica, il seguire le norme tecniche, ove presenti, diventa un mezzo sicuro per il progettista e per il datore di lavoro per poter affermare di avere soddisfatto gli obblighi derivanti dalle leggi in materia di sicurezza e ambiente.

Segue l'elenco delle norme e delle pubblicazioni, ove ISO significa l'ente mondiale di armonizzazione delle norme, con sede a Ginevra e sito internet: **www.iso.org**

ISO 10648-1, Containment enclosures, part. 1 Design principles (28 pagg.)

La norma illustra, anche con l'ausilio di numerosi disegni, diverse caratteristiche costruttive del guscio degli isolatori, inclusi i dettagli delle guarnizioni e degli elementi che trattengono le superfici trasparenti. Vi è, inoltre, una serie di considerazioni riguardanti il settore nucleare con indicazioni su schermature particolari e bracci meccanici per la manipolazione di oggetti. Il tipo di rifinitura illustrato sembra, tuttavia, inferiore agli standard richiesti per il settore farmaceutico.

ISO 10648-2, Containment enclosures, part. 2 Classification according to leak tightness and associated checking methods (14 pagg.)

Definizione di alcuni metodi di controllo della tenuta dell'isolatore mediante flussaggio di gas o per controllo dell'andamento della pressione. Tali metodi sono illustrati anche con l'ausilio di formule, disegni, tabelle e grafici.

ISO 14644- 7 Cleanrooms and associated controlled environment – Part 7 – Separative devices (clean air hoods, gloveboxes, isolators and mini-environments) (52 pagg.).

Norma molto recente (2004) che indica i requisiti minimi per il progetto, la costruzione, l'installazione il collaudo e l'approvazione delle apparecchiature di "contenimento" per quegli aspetti in cui differiscono dalle cleanroom propriamente dette e descritte nelle norme ISO 14644 – 4 e ISO 14644 – 5.

ISO 11933-1 – Components for containment enclosure – Part 1 – Glove/bag ports, bungs for glove/bag ports, enclosure rings and interchangeable units (54 pagg.).

Norma ricca di disegni dettagliati sui sistemi di fissaggio dei guanti con sistemi più o meno complessi. Sono illustrati anche sistemi di chiusura ermetica a tappo.

ISO 11933-2 – Components for containment enclosure – Part 2 – Gloves welded bags, gaiters for remote handling tongs

and for manipulators (58 pagg.).

Norma ricca di disegni dettagliati sui sistemi di fissaggio e sostituzione in sicurezza dei guanti con sistemi più o meno complessi (a due o tre cave). Sono rappresentati anche disegni dei sistemi a sacco saldabile per l'espulsione di oggetti e materiali. Sono poi illustrati sistemi di manipolazione di oggetti mediante pinze, tipici del settore nucleare.

ISO 11933-3 – Components for containment enclosure – Part 3 – Transfer systems such as plain door, airlock chambers, double door transfer systems, leaktight connections for waste drums (43 pagg.)

Sono illustrati, in questa norma, dettagli costruttivi di porte, guarnizioni e agganci per contenitori rimovibili dall'isolatore. Certamente il capitolo più interessante è il n. 7 (Double door transfer systems) ove si rappresenta il principio di funzionamento della porta (anche detta Rapid Transfer Port, RTP) che ha trovato un successo senza pari nelle applicazioni degli isolatori.

ISO 11933-4 – Components for containment enclosure – Part 4 – ventilation and gas cleaning systems such as filters, traps, safety and regulation valves, control and protection devices.

Sono qui proposti vari schemi di regolazione della pressione e alcuni sistemi di filtrazione o "lavaggio" dell'aria in uscita dagli isolatori. Taluni schemi sono poco applicati in pratica e sembrano abbastanza teorici. Tuttavia al cap. 12.1.5 è rappresentata una soluzione "push-through filter" che sta avendo numerose applicazioni pratiche grazie alla sua semplicità e grazie al fatto che è possibile smaltire il filtro esausto in completa sicurezza.

ISO 11933-5 – Components for containment enclosure – Part 5 – Penetrations for electrical and fluid circuits.

Questa parte della norma è interamente dedicata a illustrare varie soluzioni costruttive per permettere il passaggio attraverso le pareti degli isolatori da parte di cavi elettrici, tubi, ed alberi. È molto interessante per gli addetti ai lavori.

AS 4273-1999, Design, installation and use of pharmaceutical isolators (pag. 22). Ente normatore australiano

Di tale norma risultano molto utili le definizioni e le precisazioni dei termini inglesi. Si trattano, seppur in modo generico, anche gli aspetti della "pulizia", dell'avviamento, dei controlli periodici e dell'addestramento. La norma propone, poi, una classificazione, evidenziata mediante una tabella con figure, degli isolatori in base alla loro configurazione fisica rispetto all'ambiente esterno.

Ove non esistano norme tecniche, nazionali o straniere, che coprano l'argomento o il dettaglio richiesto, occorre rifarsi a linee guida, pubblicazioni e articoli reperibili sul "mercato" curando la scelta di quelle associazioni e/o autori che vantano maggiori esperienze nel campo.

HSE/MCA Handling cytotoxic drugs in isolators in NHS pharmacies (6 pagg.).

Gli enti pubblici inglesi Health and Safety Executive e Medicines Controls Agency hanno emesso questa breve guida in cui si descrivono le opposte esigenze di salvaguardia dell'operatore e di non contaminazione del prodotto durante la manipolazione di farmaci citotossici (fortemente attivi). La guida termina con una tabella di confronto tra isolatori con pressione negativa o positiva rispetto all'ambiente circostante.

HSE, Summary of the Technical Basis for the COSHH Essentials, 1999 (8 pagg.)

L'ente pubblico inglese Health and Safety Executive (HSE, Chemical Risk assessment and control unit), nella pubblicazione (HSE Books 1999 ISBN 0 7176 2434 X), preso a sua volta dagli Annals of Occupational Hygiene (vol. 42(6), 1998) espone un metodo che, partendo da considerazioni sulla pericolosità, "volatilità" e quantità della sostanza da manipolare, fornisce una "graduatoria" di misure tecniche ed ingegneristiche da adottare via via più sofisticate a seconda del rischio.

PDA Technical Report n. 34, design and validation of isolator systems for the manufacturing and testing of health care products (30 pagg.).

L'associazione PDA ha redatto questa guida che copre in maniera sufficientemente dettagliata tutti gli aspetti relativi agli isolatori sia per utilizzo finalizzato alla protezione dell'operatore che per utilizzo relativo alla sterilità del prodotto. Vengono trattati i temi dei materiali di costruzione, dell'ergonomia, della decontaminazione e della ventilazione degli isolatori. Sono trattati anche i metodi di controllo della tenuta degli isolatori basati sul sistema di caduta della pressione. Si forniscono anche indicazioni sui sistemi di decontaminazione e di controllo della sterilità.

AGS-G001-1998 (second edition) (186 pagg.). American Glovebox Society

Manuale molto completo sugli isolatori per scopi industriali. Anche se principalmente orientato al settore nucleare, tale pubblicazione riporta molti dettagli costruttivi e disegni delle soluzioni tecniche proposte. La guida fornisce indicazioni sui materiali costruttivi, sul dimensionamento dei filtri, sulla ventilazione e su quasi tutta la gamma dei particolari meccanici degli isolatori. Sicuramente si tratta di uno dei migliori testi disponibili sull'argomento.

ISPE Assessing the particulate containment performance of pharmaceutical equipment (circa 70 pagg.).

ISPE (acronimo del vecchio nome dell'associazione, International Society Pharmaceutical Engineering) ha redatto questo utile riassunto sui metodi di campionamento ed analisi delle polveri nell'ambiente esterno ad isolatori, valvole "split-butterfly" e giunti gonfiabili a tenuta. Vengono fornite indicazioni precise sulle posizioni, sui metodi di campionamento, analisi e sull'interpretazione dei risultati. Il metodo è ben descritto con i relativi riferimenti normativi, con figure, grafici e tabelle che guidano l'operatore attraverso l'esecuzione del test. Attualmente non esistono altri riferimenti così precisi sulle metodologie di controllo dei risultati del contenimento di apparecchiature.

AFI (Associazione Farmaceutici Industria), Buone Pratiche di Fabbricazione

Determinazione dei valori di OEL (Occupational Exposure Level) per i principi attivi farmaceutici. (2006)

In questa autorevole linea guida tutto il terzo capitolo (da pag. 99 a pag. 207) è dedicato a fornire indicazioni tossicologiche su ben 1456 diverse molecole che costituiscono Principi Attivi Farmaceutici (API, dall'acronimo inglese Active Pharmaceutical Ingredient).

N. Hirst, M. Brocklebank, M. Ryder – Containment systems – a design guide (199 pagg.) Ed. IChemE.

Questo libro sull'argomento è sicuramente uno dei più completi sulla scelta, sulla progettazione e sull'utilizzo degli isolatori. Scritto da esperti del settore, fornisce una panoramica completa dell'utilizzo degli isolatori negli impianti di produzione di principi attivi farmaceutici. Vi sono numerose figure, schemi e riferimenti normativi e bibliografici. Viene trattato ampiamente anche il difficile tema dell'accoppiamento tra le varie apparecchiature di impianto per mezzo di vari sistemi che forniscono diversi gradi di contenimento.

C. M. Wagner, J. E. Akers – Isolator Technology – applications in the pharmaceutical and biotechnology industries – Interpharm press (circa 360 pagg.)

Testo molto completo, con grafici, schemi e fotografie. Sono rappresentati dettagli costruttivi delle porte speciali per trasferimento di materiali. È molto attento all'applicazione degli isolatori qualora occorra preservare la sterilità del prodotto in impianti di "farmaceutico secondario". Tuttavia, anche chi è interessato all'applicazione di isolatori per la salvaguardia degli operatori troverà utili indicazioni.

9. Conclusioni

Anche se notevolmente anticipata nella trattazione precedente, è comunque opportuno ribadire la conclusione che, nonostante il loro costo, gli isolatori sono sicuramente quanto di meglio la tecnologia offra oggi per risolvere il problema dell'esposizione degli operatori ad agenti chimici o biologici potenzialmente pericolosi.

