

- 1.0 Perché andare in laboratorio
- 1.1 Norme di sicurezza, prevenzione e comportamento
- 1.2 Sicurezza in laboratorio: fattori di rischio
- 1.3 Classificazione dei microrganismi in base alla loro pericolosità
- 1.4 Laboratori e livelli di biosicurezza
- 1.5 Strumentazione di laboratorio
- 1.6 Pianificazione di un'indagine microbiologica
- 1.7 Il controllo di qualità
- 1.8 Gestione dei rifiuti di laboratorio
- 1.9 Organizzazione delle attività di laboratorio
- 1.10 Stesura di una relazione di laboratorio

1.0 Perché andare in laboratorio

Nel laboratorio di microbiologia vengono analizzati campioni provenienti da **matrici biologiche, alimentari, ambientali**. In campo medico-clinico, per esempio, potranno essere esaminati campioni di sangue o siero per la ricerca di antigeni o anticorpi, liquidi o essudati biologici per la ricerca di microrganismi patogeni. Nel caso di alimenti si potranno condurre indagini su acque potabili o minerali, latte e alimenti in genere; per il controllo dell'ambiente si valuteranno la contaminazione microbica delle acque superficiali o di balneazione, l'aria confinata di una sala operatoria, di un reparto di degenza o anche di un'aula scolastica e il terreno (analisi del suolo).

Uno degli obiettivi prioritari in **microbiologia ambientale** è la ricerca di specie microbiche in grado di degradare composti tossici e inquinanti per promuovere il **biorisanamento**.

In ogni caso l'obiettivo delle **analisi microbiologiche** consiste nel valutare il **numero (carica microbica)** e il **tipo (identificazione)** di microrganismi presenti nel campione in esame.

Un laboratorio di microbiologia.



1.1 Norme di sicurezza, prevenzione e comportamento

In laboratorio è obbligatorio osservare le norme di sicurezza, a tutela della propria e altrui incolumità.

Il laboratorio di microbiologia deve rispondere a particolari e inderogabili requisiti a tutela della sicurezza e della salute degli operatori. I locali devono essere dotati di aperture antipanico verso l'esterno e forniti delle dotazioni di legge: sensori per fughe di gas e allarmi antincendio, estintori, docce e apparecchi per il lavaggio immediato degli occhi, disponibilità di camici, cuffie, mascherine, occhiali e guanti di protezione per i tecnici addetti ai lavori.

Oltre a prevenire il pericolo rappresentato dall'impiego di sostanze chimiche, nel cui uso non è ammessa imperizia o improvvisazione, in un laboratorio microbiologico le norme di sicurezza sono rivolte a proteggere gli operatori da contaminazioni accidentali di materiale biologico potenzialmente infetto.

La manipolazione delle colture microbiche comporta infatti un elevato rischio biologico. Il contatto con gli agenti biologici può avvenire in vari modi: attraverso la pelle, le mucose, le vie aeree (sono documentati casi di contaminazione da inalazione di aerosol da colture batteriche), l'ingestione accidentale o per via parenterale.

Si rivela quindi opportuno indossare mascherine, guanti e occhiali protettivi, che fanno parte dei **Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)** per la protezione:

- del corpo
- delle mani
- degli occhi
- delle vie respiratorie.

Questi accorgimenti, validi per tutti i laboratori professionali, a maggior ragione devono ritenersi imprescindibili per i laboratori scolastici, nei quali, in ogni caso, **non è mai consentito il prelievo, l'uso e la manipolazione di campioni biologici di origine umana**. Si ricordi che anche lavorare con campioni di matrici ambientali può comportare rischio di contaminazione, qualora non si adottino le più stringenti regole di prudenza e di corretta prassi di laboratorio.

Il camice deve sempre essere indossato e non si deve uscire dal laboratorio con il camice da lavoro. Nel caso si verifichi una contaminazione accidentale, il vestiario contaminato deve subito essere sostituito e avviato al lavaggio. Per la manipolazione dei prodotti biologici inquinanti o pericolosi è necessario indossare guanti monouso, con i quali non si devono toccare altri oggetti come telefoni, maniglie o suppellettili varie. Alla fine della sessione di lavoro i guanti usati vanno gettati nel contenitore dei rifiuti speciali. Nella manipolazione di sostanze pericolose o di colture potenzialmente patogene è necessario indossare occhiali protettivi, mentre nelle operazioni che si svolgono in prossimità di fiamme libere (Bunsen) è opportuno indossare un'apposita cuffia o almeno legare i capelli, evitando di indossare sciarpe o accessori d'abbigliamento simili.

Nei laboratori di microbiologia devono essere disponibili gli occhiali di protezione e gli altri dispositivi individuali.



Dispositivi di protezione individuale da agenti biologici (DPI)

(Fonte: INAIL)

Riferimenti normativi: Decreto Legislativo 81/2008 - Regolamento (UE) 2016/425

I Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) sono attrezzature utilizzate allo scopo di tutelare la salute e la sicurezza dei lavoratori (guanti, occhiali ecc.) Gli indumenti da lavoro non sono DPI (tute, camici ecc.) e non proteggono il lavoratore da rischi specifici, ma servono a evitare di sporcare o contaminare gli abiti e devono essere tolti quando si esce dal luogo di lavoro, riposti in luogo separato dagli altri indumenti e puliti (eventualmente disinfettati) o sostituiti quando necessario.

I DPI sono classificati in tre categorie.

- **I categoria:** vi sono inclusi i dispositivi più semplici (guanti generici per normali attività di pulizia, creme barriera).
- **II categoria:** dispositivi non inclusi nei gruppi I e III.
- **III categoria:** sono destinati a proteggere da lesioni gravi, permanenti o dalla morte (per esempio, protezione delle vie respiratorie da agenti biologici pericolosi). Per l'impiego di questi dispositivi è previsto uno specifico addestramento.

Tipologia di dispositivi di protezione individuale, divisi in base ai pericoli.

Rumore	Inserti auricolari Cuffia
Gas, vapori	Maschera Indumenti
Aerosol	Maschera
Rischi biologici	Indumenti Maschera Guanti
Elettrici	Guanti Scarponi
Termici	Guanti Indumenti Schermi radianti
Meccanici	Casco Guanti Scarpe Cinture sicurezza
Liquidi	Guanti Tute

In un laboratorio di microbiologia occorre inserire occhialini, guanti, camice, cuffia e talvolta una mascherina.



Un accorgimento molto semplice da adottare per prevenire molte occasioni di contaminazioni consiste in un frequente lavaggio delle mani durante la sessione di lavoro, onde diminuire il rischio di portare inavvertitamente alla bocca microrganismi potenzialmente patogeni. È comunque indispensabile effettuare sempre tale operazione prima di lasciare il laboratorio.

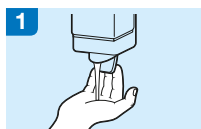
Come lavarsi le mani?

Lavare le mani quando sono sporche, oppure utilizzare le salviette monouso

Durata della procedura: 40-60 secondi



0 Bagnare le mani con acqua



1 Applicare sapone a sufficienza sino a ricoprire tutta la superficie delle mani



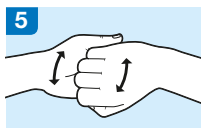
2 Strofinare le mani da un palmo all'altro



3 Palmo destro sul dorso sinistro incrociando le dita e viceversa



4 Palmo a palmo con le dita intrecciate



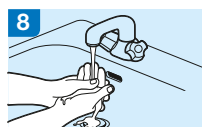
5 Di nuovo le dita, opponendo i palmi con dita racchiuse, una mano con l'altra



6 Strofinare attraverso rotazione del pollice sinistro sul palmo destro e viceversa



7 Strofinare attraverso rotazione all'indietro e in avanti con le dita della mano destra sul palmo sinistro e viceversa



8 Risciacquare le mani con acqua



9 Asciugare le mani con una salvietta monouso



10 Usare la salvietta per chiudere il rubinetto



11 Le mani sono ora pulite

La procedura corretta per lavarsi le mani in laboratorio.

fonte: World Health Organization

In laboratorio non è consentito mangiare, bere o fumare. Se materiale biologico contamina il piano di lavoro, si deve coprire la superficie con un disinfettante adatto, attendere qualche minuto, quindi assorbire con carta ed eliminare, ovviamente usando i guanti.

Evitare nel modo più assoluto di pipettare liquidi con la bocca: impiegare sempre pipette automatiche o appositi sistemi di aspirazione per pipette (**propipette**).

Le operazioni chimiche che possono dare luogo a sviluppo di vapori nocivi o tossici si devono effettuare sotto apposite **cappe aspiranti**, mentre le colture microbiologiche vanno manipolate all'interno di **cappe di sterilità e sicurezza a flusso laminare**, dotate di idoneo sistema di protezione dell'operatore. La cappa a flusso laminare è l'unico ambiente dove si devono eseguire tutte le operazioni microbiologiche (semine, trapianti, distribuzione in piastra o provetta dei terreni di coltura sterilizzati, allestimento dei vetrini per l'osservazione microscopica ecc.).

Se sottoposta a regolare manutenzione, una cappa a flusso laminare per microbiologia permette di lavorare in ambiente sterile, impedendo all'aria ambiente di penetrare al suo interno. Va messa sempre in funzione alcuni minuti prima dell'utilizzo.

È altresì vietato dalla buona prassi di laboratorio abbandonare apparecchiature in funzione.

1 IL LABORATORIO MICROBIOLOGICO

I banchi di lavoro devono risultare dotati di superfici senza interruzione di continuità a prova di acido, facilmente lavabili e disinfettabili, in locali dotati di un efficiente sistema di ricambio dell'aria e ben illuminati.

1.2 Sicurezza in laboratorio: fattori di rischio

In tutti i luoghi di lavoro cartelli di avvertimento come i seguenti segnalano i pericoli presenti:



protezione obbligatoria degli occhi



protezione obbligatoria delle vie respiratorie



guanti di protezione obbligatoria



protezione obbligatoria del corpo



protezione obbligatoria del viso



obbligo generico (con eventuale cartello supplementare)

Il lavoro in laboratorio comporta **rischi di natura biologica** (possibilità di contagio da agenti patogeni), **chimica** (impiego di sostanze tossiche) e **fisica** (sostanze radioattive, utilizzo di strumentazioni e apparecchiature). Tali rischi sono segnalati da segnali e simboli specifici.

CARTELLI DI AVVERTIMENTO

Hanno lo scopo di avvertire di un rischio o di un pericolo le persone esposte (forma triangolare o quadrata, pittogramma nero su fondo bianco, bordo rosso o su fondo giallo, bordo nero). Di seguito alcuni esempi.



Carichi sospesi



Materiali radioattivi



Pericolo generico



Rischio biologico

Rischio biologico

In un laboratorio microbiologico si trattano microrganismi patogeni o potenzialmente tali: è quindi tassativamente obbligatorio adottare tutte le precauzioni atte a impedire il contatto con gli agenti microbici e operare in sterilità.

Gli operatori sono esposti a varie tipologie di rischio: biologico, chimico e fisico. Il **documento giuridico di base dell'Unione Europea per la sicurezza sul lavoro** è il **DL 626/1994** riguardante tutte le tipologie di lavoratori. Un aspetto importante è anche quello relativo alla responsabilità personale, per quanto concerne la conoscenza dei pericoli e l'obbligo del lavoratore di seguire le norme di comportamento e sicurezza stabilite dalle norme. Un più recente decreto in materia di sicurezza è il **DL 81 del 2008**, inoltre esistono documenti normativi dell'OMS in materia di sicurezza.

I microrganismi vengono collocati in **quattro differenti gruppi di rischio** in base a criteri diversi, quali patogenicità, trasmissibilità, disponibilità di misure di profilassi, grado di rischio per il lavoratore.

Classificazione degli agenti biologici (D.L. 81/2008 Titolo X).

Gruppi di rischio	Caratteristiche	Esempi di microrganismi classificati nel gruppo
1	Poche probabilità di causare malattie nell'uomo.	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Streptococcus gallinarum</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
2	Può causare malattie nell'uomo; può costituire un rischio per i lavoratori; ha poche probabilità di propagarsi nella comunità; di norma si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Virus influenzale tipi A, B, C Herpesvirus varicella-zoster <i>Toxoplasma gondii</i>
3	Può causare malattie gravi nell'uomo; costituisce un serio rischio per i lavoratori; può propagarsi nella comunità; di norma si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Yersinia pestis</i> Virus dell'epatite B HIV HTLV 1
4	Può causare malattie gravi nell'uomo; costituisce un serio rischio per i lavoratori; ha un'elevata probabilità di propagarsi nella comunità; di norma non si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.	Virus Lassa Virus Ebola Virus di Marburg Variola (major & minor) virus

Rischio di esposizione al contagio

Le vie di esposizione al contagio sono diverse: contatto, inalazione, ingestione, inoculazione. Tra queste, l'ingestione non dovrebbe essere contemplata, dal momento che in laboratorio nessun oggetto o cibo o bevanda deve essere portata a contatto con la bocca, in particolare le mani. Uno dei rischi di grado più elevato è invece l'inalazione di **aerosol**, sotto forma di microscopiche particelle solide o goccioline liquide dalle colture, in particolare al momento del prelievo di materiale (colonie microbiche) dalle piastre di coltura.

Rischi e misure di prevenzione rispetto alla formazione di aerosol.

Operazioni con possibile formazione di aerosol	Misure di sicurezza da adottare
Sterilizzazione dell'ansa alla fiamma del Bunsen	<ul style="list-style-type: none"> Evitare la sterilizzazione alla fiamma usando anse sterili in plastica monouso In caso di manipolazioni a rischio operare con cappe di sicurezza biologica
Pipettaggio	<ul style="list-style-type: none"> Non aspirare a bocca, adottare pipettatori o micropipette Mantenere le micropipette nei supporti verticali per ridurre le contaminazioni Preferire le pipette a spazio morto, evitare sgocciolamenti Per manipolazioni a rischio operare con cappe di sicurezza
Omogeneizzazione	<ul style="list-style-type: none"> Adottare apparecchi con contenitori a tenuta In caso di manipolazioni con materiale infetto posizionare l'apparecchio all'interno della cappa di sicurezza biologica
Centrifugazione	<ul style="list-style-type: none"> Utilizzare provette per centrifuga con tappo In caso di manipolazioni con materiale infetto posizionare l'apparecchio all'interno della cappa di sicurezza biologica
Apertura di contenitori	<ul style="list-style-type: none"> Evitare l'agitazione del contenitore Per materiali a rischio operare con cappe di sicurezza biologica
Autoclavatura	<ul style="list-style-type: none"> Impiegare autoclavi con sistema di raccolta del vapore iniziale, non ancora sterilizzato

L'impiego di **guanti monouso** in lattice o in nitrile protegge dal contatto con materiali contaminati durante le operazioni di manipolazione delle colture microbiche: vanno comunque tolti ed eliminati al termine delle operazioni, senza toccare altri oggetti non contaminati. L'uso di **occhiali** protegge da schizzi di liquidi contaminati o di reattivi impiegati nell'analisi, la **mascherina** (di cui esistono tipologie diverse da scegliere in relazione al possibile rischio insito nel lavoro da svolgere) protegge dall'inalazione di vapori chimici e di aerosol microbiologico.

Il contagio per inoculazione si verifica in seguito a punture accidentali oppure a tagli conseguenti alla rottura di oggetti in vetro: si comprende, quindi, come un comportamento attento e responsabile sia di primaria importanza per la prevenzione di rischi di ogni tipo.

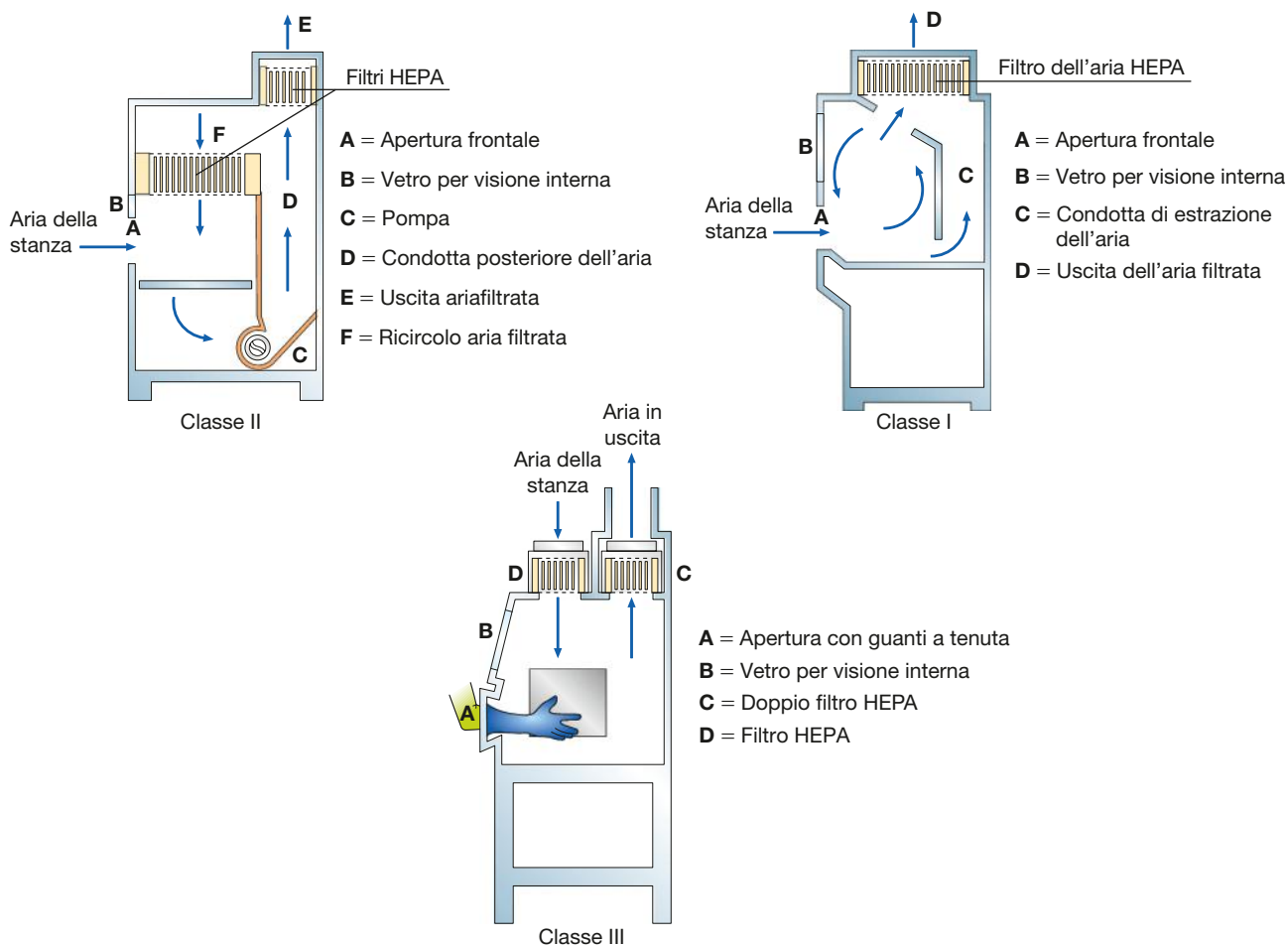
Il materiale contaminato deve essere eliminato solo dopo sterilizzazione in autoclave, una volta che esso è stato chiuso in sacchetti monouso autoclavabili, quindi eliminato secondo le procedure in uso per l'eliminazione dei rifiuti. Nel caso di impiego di disinfettanti, questi vanno lasciati agire a contatto con il materiale contaminato per il tempo prescritto in relazione alla tipologia del prodotto impiegato. Prodotti disinfettanti devono essere usati anche per decontaminare le superfici di lavoro. L'impiego in laboratorio di **microrganismi geneticamente modificati** (MGM) è regolamentato da DL 206/2001, in cui viene stabilito il loro impiego in ambienti confinati, suddivisi in quattro classi che corrispondono ad altrettanti livelli di contenimento. Le precauzioni sono ovvie in quanto la modificazione del DNA batterico può riguardare geni che codificano per fattori di virulenza o resistenza agli antibiotici; anche la modificazione di geni innocui, tuttavia, può innescare fenomeni di trasformazione in senso virulento o patogeno.

Cappe per microbiologia

L'impiego sistematico di **cappe per microbiologia** consente la protezione sia dell'operatore sia dell'ambiente. Le cappe per microbiologia sono cappe di sicurezza microbiologica in grado di proteggere operatore, ambiente, ma anche (a seconda del modello) le colture da contaminazioni esterne. L'aria esterna viene immessa forzatamente all'interno e sterilizzata per filtrazione con filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air*), che possono trattenere particelle del diametro di 0,3 μm con una efficienza che può arrivare al 99,99%. Queste cappe non sono però adatte alla prevenzione del rischio chimico.

In base al livello di sicurezza offerto, le cappe di sicurezza per microbiologia si suddividono in tre classi. Le cappe appartenenti alle prime due classi sono dotate di uno schermo protettivo frontale in vetro che lasciano all'operatore uno spazio utile alto circa 20 cm.

- **Classe I:** proteggono operatore e ambiente, ma non le colture su cui si opera. L'aria viene aspirata dall'esterno, passa sul piano di lavoro, viene poi filtrata ed espulsa nuovamente in ambiente.
- **Classe II:** offrono protezione a operatore, ambiente e colture su cui si lavora. L'aria ambiente viene aspirata sotto il piano di lavoro, poi mandata verso l'alto, filtrata e inviata con flusso verticale sul piano di lavoro; infine, dopo ulteriore filtrazione, viene in parte espulsa e in parte riciclata. Sono impie-



gate per microrganismi appartenenti alle classi 2 e 3. Le cappe di classe II si suddividono a loro volta in più sottoclassi, in relazione alla percentuale di aria riciclata rispetto a quella espulsa definitivamente.

- **Classe III:** si tratta di box a chiusura ermetica adatti per la manipolazione di agenti microbici appartenenti al gruppo 4, dotati di manicotti di gomma pesante attraverso cui l'operatore può lavorare. L'aria è aspirata sul piano di lavoro dopo filtrazione e immessa nuovamente in ambiente dopo ulteriore filtrazione.



Avvertenze generali per l'uso delle cappe

- È opportuno mettere in funzione le cappe per microbiologia almeno una decina di minuti prima di procedere al lavoro e per lo stesso tempo al termine del lavoro allo scopo di consentire un ricambio e una decontaminazione dell'aria "sotto cappa".
- Le griglie di aspirazione non devono essere ostruite da materiali vari.
- Occorre limitare per quanto possibile gli spostamenti fuori e dentro cappa durante il lavoro.
- Il materiale contaminato va raccolto e chiuso in sacchetti autoclavabili prima di portarli fuori dalla cappa.
- Le attrezzature devono essere disinfettate prima di essere collocate fuori cappa.
- L'operatore deve indossare camice e guanti, in quanto le cappe di classe I e II non proteggono mani e avambracci.

Procedure di sterilità

Lavorare in sterilità è un imperativo categorico per il tecnico che opera nel laboratorio microbiologico. È bene chiarire che la sterilità (assenza completa di ogni forma vitale) è un concetto assoluto e non relativo: un oggetto è sterile oppure non lo è, non esiste un oggetto più sterile di un altro. Lavorare in sterilità significa:

- impedire che germi di qualsiasi provenienza contaminino i campioni da esaminare (la conseguenza sarebbe l'impossibilità di discriminare quelli eventualmente presenti all'origine nel campione e quelli che lo hanno accidentalmente contaminato);
- impiegare materiale sterile nelle procedure analitiche (terreni di coltura, anse, aghi, spatole, vetreria ecc.);
- non toccare con le mani i materiali sterili né parlare durante le operazioni da eseguire in sterilità;
- lavorare sempre sotto cappa o almeno in campo sterile fra la fiamma di due Bunsen accesi posti alla distanza di 30-40 cm;
- acquisire una completa padronanza nell'uso dell'autoclave, anche al fine di garantire lo svolgimento delle operazioni in assoluta sicurezza.

Sistemi di aspirazione

Il prelievo e il trasferimento di materiali e campioni liquidi per mezzo di pipette non devono mai essere fatti a bocca, ma esclusivamente utilizzando attrezzature appositamente studiate (pipette automatiche) o "pipettatori" in cui va inserita la pipetta in vetro prescelta di volta in volta. Questi sistemi sono dotati di pulsanti per l'aspirazione e per il rilascio: occorre prestare attenzione all'eventuale possibilità di gocciolamento del campione sul piano di lavoro o sulle mani dell'operatore (obbligo dell'impiego di guanti monouso).

Rischio chimico

Nel laboratorio microbiologico vengono impiegate correntemente sostanze chimiche (coloranti, reattivi vari, ingredienti dei terreni di coltura). Le sostanze chimiche pericolose sono classificate in **classi di pericolo** con relativi sim-



I nuovi simboli di rischio chimico.

boli riportati sulle confezioni per renderle immediatamente riconoscibili e poter adottare immediati interventi di prevenzione o protezione. Oltre ai simboli sono presenti, in etichetta, frasi di rischio e, a volte, codici alfanumerici che spiegano la natura del pericolo, le precauzioni da adottare e le misure per prevenire e minimizzare gli eventuali danni. Il **Regolamento CE 1272/2008** classifica ed etichetta i composti chimici secondo un sistema internazionale (**GHS**) globalmente accettato. Gli stessi produttori predispongono specifiche schede di sicurezza per i loro prodotti. Le vie di esposizione per gli operatori sono praticamente le stesse del rischio biologico, cioè inalazione, contatto, ingestione, lesioni: si devono quindi adottare le misure individuali di prevenzione, protezione e sicurezza più appropriate. Una cautela particolare va riservata alla fiamma Bunsen, che deve essere sempre spenta in presenza di sostanze o reattivi infiammabili. Il sodio azide (NaN_3), componente tossico di terreni liquidi selettivi, può dare origine a composti potenzialmente esplosivi a contatto con le tubature di rame e piombo dei lavandini: se viene versato nelle tubature occorre fare scorrere contemporaneamente molta acqua.

Rischio fisico

In questa categoria di rischio rientra l'uso del gas (impiego del fornello Bunsen, a volte usato per creare un "campo sterile" sul piano di lavoro e di cui spesso viene impiegata la fiamma ossidante che risulta difficile da vedere). Il vapore dell'autoclave all'apertura, il travaso di liquidi bollenti, il contatto con contenitori caldi possono essere naturalmente causa di ustioni. L'impianto elettrico deve essere ovviamente a norma, dotato di messa a terra: l'operatore deve astenersi in ogni caso dall'estrarre la spina dalla presa di corrente impugnando il cavo ed evitare di sovraccaricare una stessa presa con più apparecchi. Anche le lampade germicide UV sono fonte di pericolo.

1.3 Classificazione dei microrganismi in base alla loro pericolosità

In tutti i quadri normativi di riferimento i microrganismi sono classificati in **quattro gruppi di rischio** sulla base dei seguenti criteri:

- **patogenicità**, ovvero la capacità di provocare malattie di diversa gravità;
- **trasmissibilità**, cioè la possibilità di provocare contagio nella popolazione;
- disponibilità di efficaci **misure di profilassi**, termine utilizzato per indicare gli interventi di prevenzione, come le vaccinazioni;
- disponibilità di efficaci **misure di terapia**, quale la somministrazione di antibiotici o di farmaci antivirali;
- **grado di rischio per il lavoratore**, in termini di giudizio dato al rischio, per esempio: un agente biologico del terzo gruppo, come *Mycobacterium tuberculosis* "costituisce un serio rischio per i lavoratori".

Gruppo 1: poche probabilità di causare malattie nell'uomo.

Gruppo 2: può causare malattie nell'uomo; può costituire un rischio per i lavoratori; ha poche probabilità di propagarsi nella comunità; di norma si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.

Gruppo 3: può causare malattie gravi nell'uomo; costituisce un serio rischio per i lavoratori; può propagarsi nella comunità; di norma si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.

Gruppo 4: può causare malattie gravi nell'uomo; costituisce un serio rischio per i lavoratori; ha un'elevata probabilità di propagarsi nella comunità; di norma **non si hanno misure profilattiche e terapeutiche efficaci.**

I **microrganismi a rischio**, eventualmente presenti nei campioni, possono contaminare, oltre all'operatore, le strutture del laboratorio e l'ambiente esterno. Si deve quindi evitare che vengano a contatto con gli operatori e che possano diffondere nell'ambiente, sia interno al laboratorio sia esterno. Bisogna pertanto adottare dei sistemi di protezione, indicati da alcuni Enti preposti al controllo, come i **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, con l'espressione di barriere primarie e secondarie.

- Le **barriere primarie** comprendono i cosiddetti dispositivi di protezione individuale (DPI), quali camice, guanti, occhiali e cappe di sicurezza.
- Le **barriere secondarie** sono costituite dalle strutture a protezione soprattutto dalla propagazione dei microrganismi fuori dal laboratorio, come l'autoclave per la sterilizzazione dei rifiuti contaminati e gli accessi a doppia porta al laboratorio.

1.4 Laboratori e livelli di biosicurezza

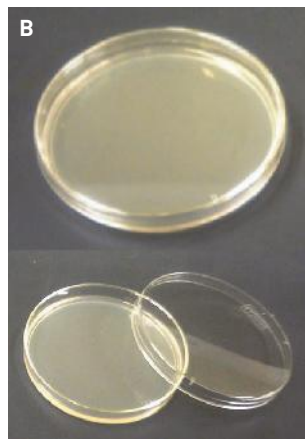
Anche i laboratori sono classificati, in base alle misure di contenimento presenti, in **quattro livelli di biosicurezza** (*Biosafety Laboratory Level*). Il livello 1 non prevede particolari misure di contenimento.

- Nei **livelli 1 e 2** sono classificati i laboratori di base, come quelli scolastici; sono normalmente di **livello 3** i laboratori degli ospedali.
- In ogni laboratorio le procedure operative devono essere svolte secondo la cosiddetta **Buona Prassi Microbiologica**, espressione con cui si riassumono l'insieme delle tecniche finalizzate sia a promuovere la sicurezza e a ridurre i rischi sia a effettuare le analisi secondo metodi validi e protocolli standardizzati. Anche operando con i microrganismi di **gruppo 1** è bene seguire la buona pratica microbiologica in tutte le sue parti.
- I laboratori di **livello 4**, cioè di massimo contenimento, sono eccezioni. In Italia ve ne sono due, a Milano e a Roma: Azienda Ospedaliera Ospedale Luigi Sacco (Milano) e Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Ospedale Lazzaro Spallanzani (Roma). Questo livello è necessario per lavorare con agenti pericolosi ed esotici che presentano un elevato rischio di trasmissione di infezioni in laboratorio per via aerea, con agenti che causano gravi malattie mortali in esseri umani per le quali non sono disponibili vaccini o altri trattamenti, per esempio le febbri emorragiche boliviane e argentine, Marburg virus, Ebola virus, Lassa virus, febbre emorragica Crimea-Congo e varie altre patologie emorragiche. Questo livello è utilizzato anche per lavorare con agenti quali il vaiolo, che sono considerati abbastanza pericolosi da richiedere ulteriori misure di sicurezza, indipendentemente dalla disponibilità di vaccinazione.

Quando si tratta di rischi biologici a questo livello, l'uso di una tuta personale a pressione positiva, con una fornitura di aria separata, è obbligatoria.

- L'entrata e l'uscita da un laboratorio biologico di livello quattro prevede docce, una camera a vuoto, una camera con luce ultravioletta e altre misure di sicurezza volte a distruggere tutte le tracce del rischio biologico. Vengono impiegati varchi di accesso a tenuta stagna e sigillabili, protetti elettronicamente per evitare che entrambe le porte siano aperte contemporaneamente. Tutta l'aria e acqua utilizzata in un laboratorio con livello di biosicurezza 4 è oggetto di procedure di decontaminazione e di sicurezza per evitare la possibilità di un rilascio accidentale.
- I membri del personale di questi laboratori hanno una **formazione specifica e approfondita nella gestione degli agenti infettivi estremamente pericolosi** e comprendono le funzioni del sistema di contenimento primario e secondario, delle pratiche standard e speciali, delle attrezzature di contenimento e le caratteristiche di progettazione in generale del laboratorio. Sono seguiti da scienziati qualificati e con esperienza nel lavoro con questi agenti. L'accesso al laboratorio è strettamente controllato dal direttore del laboratorio.
- La struttura è collocata o in un edificio separato o in una zona controllata all'interno di un edificio, completamente isolata da tutte le altre aree. Deve essere realizzato un manuale specifico per le operazioni e devono essere previsti specifici protocolli di costruzione per prevenire la contaminazione con l'esterno. Spesso si utilizzano impianti in pressione negativa che, anche se compromessi, sono comunque in grado di inibire la creazione di un focolaio di agenti patogeni trasmissibili per via aerea.

1.5 Strumentazione di laboratorio



Strumentazione di laboratorio: anse per batteriologia (A), piastre Petri (B), pipetta (C) e pipetta automatica (D), dispositivo di aspirazione per pipetta (E) e vetreria graduata (F).

1 IL LABORATORIO MICROBIOLOGICO

Apparecchiature per la sterilizzazione: autoclave (A), stufa a secco (B) e sterilizzatrice UV (C).



Le attrezzature molto sofisticate di cui sono dotati i moderni laboratori richiedono l'intervento di tecnici specializzati che siano in grado di gestirli al meglio. Le conoscenze teorico-pratiche che consentono lo svolgimento ottimale delle proprie competenze sono requisiti indispensabili, insieme con l'abilità manuale, che rimane comunque uno dei primi requisiti di un tecnico analista.

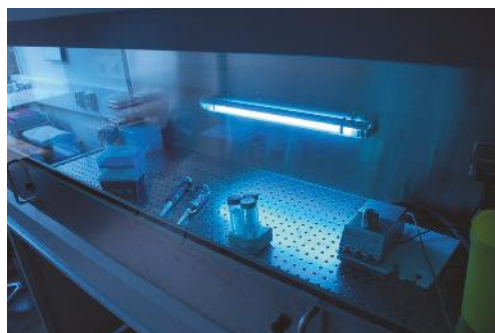
Di seguito sono elencati gli strumenti e le apparecchiature di uso più comune nel laboratorio microbiologico.

- Anse, aghi e spatole per microbiologia. Vengono impiegati per l'inoculo e il trasferimento dei microrganismi in coltura. Quelli in nickel-cromo o platino si sterilizzano sulla fiamma del Bunsen prima e dopo ogni operazione.
- Piastre Petri: contengono i terreni di coltura agarizzati.
- Pipette e pipette automatiche: sono impiegate per l'aspirazione e il trasferimento di liquidi.
- Dispositivi di aspirazione per pipette: sono impiegati per aspirare volumi precisi di liquidi con le comuni pipette in vetro o plastica monouso.
- Vetreria graduata: per l'accurata misurazione di liquidi.
- Apparecchi per la sterilizzazione (stufa a secco, autoclave, sterilizzatrice UV). L'autoclave è impiegata per la sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione, la stufa a secco per la sterilizzazione ad aria calda a temperature elevate, la sterilizzatrice UV per i materiali che non sopportano alte temperature.
- Centrifuga: permette di separare velocemente i componenti di una sospensione in base al loro peso specifico. Sul fondo della provetta (da centrifuga, a fondo conico) si depositano le particelle più pesanti, nella parte superiore rimane il sopranatante.
- Termostato e bagno termostatico: per l'incubazione delle colture microbiche o il mantenimento di materiale liquido a temperatura prefissata e costante.
- Spettrofotometro UV-VIS: misura l'assorbimento o la trasmissione della luce da parte di soluzioni, nel campo del visibile o dell'ultravioletto.
- Cappa a flusso laminare con protezione dell'operatore: impiegata per tutte le operazioni che coinvolgono colture microbiche. Permette di lavorare in ambiente sterile.
- Cappa di aspirazione per reagenti chimici: impiegata per la manipolazione di sostanze pericolose.
- Giara per colture in anaerobiosi (GasPacK) per la coltivazione di microrganismi anaerobi o in atmosfera arricchita in CO_2 .

Bagno termostatico.

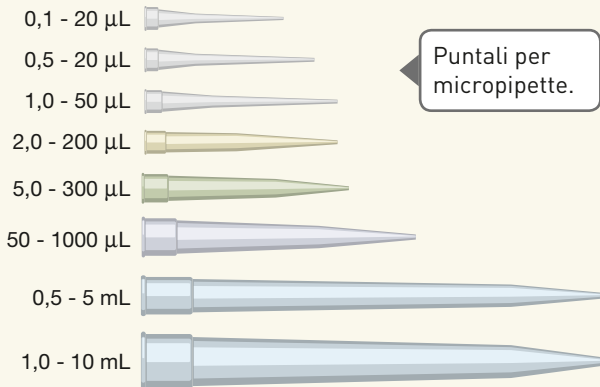


Cappa a flusso laminare.



Micropipette automatiche

Le micropipette automatiche (a gradazione fissa o variabile) trasferiscono volumi molto piccoli di materiale (μL o loro frazioni) e richiedono l'uso di specifici puntali, che possono essere espulsi in modo automatico.

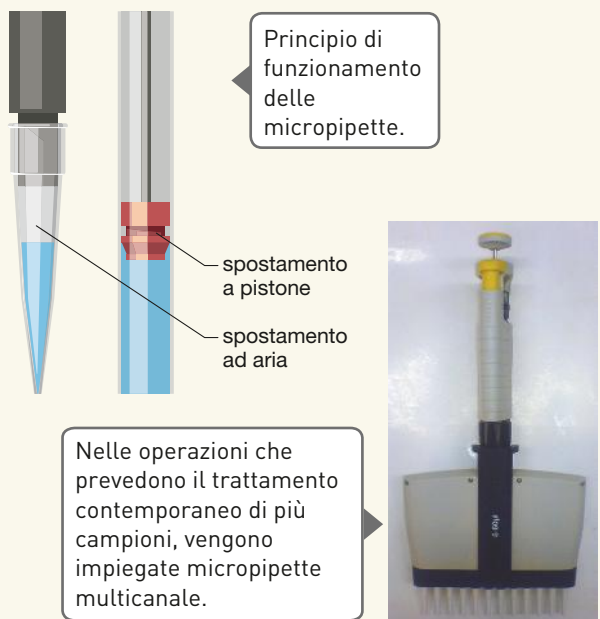


Le micropipette possono essere a volume fisso oppure variabile: in questo ultimo caso sono dotate di una ghiera di regolazione per l'aspirazione di volumi di campione prefissati dall'operatore, entro intervalli specifici per ogni categoria di pipetta.



Le micropipette possiedono caratteristiche di alta precisione; l'aspirazione del liquido è permessa da un pistone con guarnizioni a perfetta tenuta, che scorre all'interno del corpo, generalmente in materiale plastico.

Nelle micropipette che funzionano "a spostamento d'aria" il liquido non viene a contatto con il corpo della pipetta; in quelle "a spostamento diretto" il pistone aspira e spinge direttamente il liquido con cui viene a contatto.



Volume	Tacche	Volumi considerati	Precisione	Coefficiente di variazione
μL	μL	μL	$\pm \mu\text{L}$	$\leq \mu\text{L}$
0,1-2,5	0,05	0,2	0,08	0,04
		0,5	0,08	0,04
		1	0,08	0,04
		2	0,08	0,04
0,5-10	0,1	1	0,12	0,08
		5	0,12	0,08
		10	0,12	0,08
2-20	0,5	2	0,20	0,10
		10	0,20	0,10
		20	0,20	0,10
10-100	1,0	10	0,80	0,30
		50	0,80	0,30
		100	0,80	0,30
20-200	1,0	20	1,60	0,60
		100	1,60	0,60
		200	1,60	0,60
100-1000	5,0	100	8	3
		500	8	3
		1000	8	3
1000-5000	50,0	500	40	15
		2500	40	15
		5000	40	15

Il pipettaggio

L'aspirazione e l'erogazione di volumi precisi di liquido viene definita **pipettaggio**. Con le pipette a cuscino d'aria (*air interface*), in cui il liquido resta sempre separato dal pistone interno e che funzionano con meccanismo di sovrappressione e depressione, si opera in genere nel campo dei microlitri fino ai millilitri. Occorre procedere regolarmente al controllo (**taratura**) e alla eventuale **calibrazione** delle micropipette.

Dopo aver controllato attentamente che la micropipetta corrisponda esattamente alle caratteristiche richieste (volume erogabile e taratura), il corretto modo di procedere prevede tre operazioni in successione: aspirazione, erogazione, espulsione del puntale.

1 Aspirazione

- Tenere la pipetta verticalmente, premere il pulsante fino al primo scatto, immergere la parte terminale del puntale nel liquido.
- Rilasciare lentamente il pulsante della pipetta: il liquido viene aspirato.

2 Erogazione

- Premere il pulsante lentamente fino al 1° scatto; tenerlo premuto.
- Premere il tasto di pipettaggio fino al 2° scatto per svuotare completamente il puntale.

3 Espulsione del puntale

Nelle pipette con espulsore, premere il pulsante di espulsione, diversamente rimuoverlo manualmente (impiegare i guanti).

Pipette mono e multicanale elettroniche

In queste pipette il pistone di aspirazione ed erogazione viene mosso da un motore, mentre un microprocessore controlla e gestisce i volumi del liquido. Dopo l'impostazione del programma, la pressione del pulsante di pipettaggio aziona automaticamente il meccanismo di aspirazione; una nuova pressione del pulsante ne determina lo scarico.



Una pipetta elettronica.

Becco Bunsen.



- **Conta colonie:** strumento che facilita il conteggio delle colonie microbiche sui terreni in piastra.
- **Microscopio ottico o biologico:** per l'osservazione dei batteri sono richiesti ingrandimenti di 1000× con obiettivi "a immersione", per lieviti e muffe sono generalmente sufficienti ingrandimenti inferiori (400×).
- **Terreni di coltura:** si possono preparare utilizzando confezioni di ingredienti premiscelati in polvere, ma sono disponibili anche già pronti in piastra o provetta.
- **Becco Bunsen:** viene utilizzato per la sterilizzazione di aghi e anse (che vengono portati all'incandescenza per l'incenerimento dei microrganismi prelevati e trasferiti con questi strumenti) e per le operazioni di "flambatura" (passaggio veloce sulla fiamma) dell'imboccatura di beute e provette.
- **L'omogeneizzatore (tipo "Stomacher")** impiega sacchetti sterili in plastica per l'omogeneizzazione dei campioni di una certa consistenza, in particolare nell'analisi di matrici alimentari.

- Sistemi di filtrazione su membrana: impiegati per il conteggio di microrganismi con la tecnica delle membrane filtranti (MF).
- Bilancia tecnica: per la pesata dei terreni di coltura in polvere, dei coloranti e di altre sostanze.

1.6 Pianificazione di un'indagine microbiologica

Le ricerche microbiologiche possono essere di varie tipologie e condotte con obiettivi diversi, ma si svolgono comunque attraverso alcune fasi che è opportuno pianificare a priori per organizzare il lavoro nel modo più opportuno e conveniente. Un'indagine microbiologica si svolge schematicamente attraverso le seguenti fasi operative:

- **definizione degli obiettivi:** in genere consistono nell'isolamento, identificazione e conteggio (se richiesto) dei microrganismi presenti in una matrice di origine biologica o ambientale;
- **individuazione del percorso** da seguire, che si traduce in pratica nella scelta della metodica più adatta;
- **comprensione** della procedura prevista dal protocollo di analisi prescelto;
- **pianificazione del lavoro** (distribuzione dei compiti, preparazione e sterilizzazione del materiale e dei terreni di coltura, allestimento di reagenti o soluzioni);
- **esecuzione** dell'analisi;
- **raccolta dei dati;**
- **controllo, elaborazione e interpretazione** dei risultati ottenuti.

A monte di tutto ciò, deve essere compresa l'importanza fondamentale della fase di **prelievo e preparazione del campione**, il quale va:

- prelevato in sterilità;
- conservato a +4 °C fino al momento dell'analisi;
- analizzato al più presto o comunque entro 24 h;
- accuratamente miscelato o omogeneizzato prima di procedere all'analisi.

1.7 Il controllo di qualità

Come in tutti i laboratori, anche in quello microbiologico è d'obbligo effettuare un periodico controllo della qualità delle procedure, dei materiali di consumo utilizzati (reagenti, terreni di coltura) e del corretto funzionamento della strumentazione e delle apparecchiature. In microbiologia il controllo di qualità si articola in diversi livelli di intervento.



Sistemi di filtrazione su membrana.



Bilancia tecnica.

Controlli di sterilità dei terreni di coltura

Ogni volta che si utilizzano terreni di coltura per semine o trapianti di microrganismi è opportuno affiancare alle piastre inoculate almeno una piastra dello stesso terreno non inocolata. Tale piastra verrà incubata insieme con le altre e dovrà risultare sterile al termine del periodo di incubazione.

Quando si impiega l'autoclave per la sterilizzazione di terreni di coltura o qualsiasi altro materiale, si deve inserire all'interno dell'autoclave un sistema che indichi se al termine del ciclo di sterilizzazione questa sia effettivamente avvenuta. Esistono diverse modalità per eseguire questo controllo, che si avvalgono di sistemi semplici e pronti all'uso.

Controlli di affidabilità e di precisione diagnostica

I laboratori di microbiologia sono in genere inseriti in un programma di controllo interlaboratoriale per la validazione dei risultati. In pratica ricevono periodicamente colture liofilizzate di microrganismi incogniti da identificare. In base all'esattezza del risultato, al laboratorio è assegnata una valutazione di merito.

L'impiego di spettrofotometri UV-VIS o altri apparecchi di misura necessita di una costante verifica della precisione strumentale, che si può ottenere affiancando quotidianamente ai campioni in esame soluzioni a titolo noto: lo strumento viene giudicato ben tarato se il risultato ottenuto rientra in un preciso intervallo di tolleranza.

Controlli periodici da effettuare

È opportuno procedere periodicamente a un controllo della **contaminazione microbica delle superfici**, in particolare quelle dei piani di lavoro. A questo proposito può essere verosimile stimare normale una situazione come quella di seguito riportata (UFC = Unità Formanti Colonie):

Carica microbica superficiale prima del trattamento	Carica microbica dopo il trattamento di disinfezione
50-100 UFC/cm ²	0,5-1 UFC/cm ²

È indispensabile controllare l'effettivo ed efficace funzionamento delle **cappe a flusso laminare**, cioè verificare periodicamente la sterilità dell'aria al loro interno. A tale scopo, con la cappa in funzione da almeno 10-20 minuti, si lasciano 5 piastre con terreno *Plate Count Agar* (PCA) aperte al suo interno, quindi si richiudono e si procede all'incubazione a 30 °C per 72 ore. Al termine dell'incubazione non si devono osservare colonie di microrganismi.

Controllo della conservazione e della scadenza dei materiali di consumo

Terreni di coltura, reagenti, soluzioni, kit per l'identificazione dei microrganismi vanno conservati (salvo diversa indicazione) in frigorifero. Alla scadenza non devono essere più utilizzati, pena l'inaffidabilità dei risultati. Ne consegue la necessità di un'attenta programmazione delle attività di laboratorio, onde evitare inutili (e assai costosi) sprechi.

Normative che regolamentano i rifiuti

La gestione dei rifiuti è regolamentata in tutte le sue fasi: raccolta, deposito temporaneo, trasporto e smaltimento.

- **Legge 31 luglio 2002, n. 179** (Art. 24).
- **DPR 15 luglio 2003**, n. 254, regolamento recante disciplina della gestione dei **rifiuti sanitari** a norma dell'art. 24 della legge 31 luglio 2002, n. 179.
- **Dlgs 152 del 2006** e successive modificazioni.
- Decreto legislativo **3 dicembre 2010, n. 205**, che recepisce nell'ordinamento italiano la **Direttiva Europea 2008/98/CE** sui rifiuti, collegando il Dlgs. 152/2006 in materia di rifiuti e il nuovo sistema di controllo della loro tracciabilità (SISTRI).
- **Direttiva 2018/851 CE**.
- **CM 21/01/2019**, Ministero dell'Ambiente in materia di sicurezza sul lavoro.

Le normative utilizzano una serie di parametri e sigle, fra cui le seguenti:

- **Caratteristiche chimico-fisiche del rifiuto**: caratteristiche chimico-fisiche del rifiuto e specifiche caratteristiche (per es. aspetto esteriore), in modo che il rifiuto possa essere identificato con la massima accuratezza qualora la descrizione del CER non fosse esaustiva, soprattutto per i codici generici che terminano con le cifre 99 (Rifiuti non specificati altrimenti).
- **Caratteristiche di pericolo**: in caso di rifiuti pericolosi, le caratteristiche di pericolo codificate e individuate sulla base dell'allegato I al Decreto 3 Dicembre 2010 n. 205:
 - H 1 Esplosivi;
 - H 2 Comburente;
 - H 3-A Facilmente Infiammabile;
 - H 3-B Infiammabile;
 - H 4 Irritante;
 - H 5 Nocivo;
 - H 6 Tossico (incluso molto tossico);
 - H 7 Cancerogeno;
 - H 8 Corrosivo;
 - H 9 Infettivo;
 - H 10 Tossico per la riproduzione;
 - H 11 Mutageno;
 - H 12 Rifiuti che a contatto con l'acqua liberano gas tossici;
 - H 13 Sensibilizzanti;
 - H 14 Ecotossico;
 - H15 Rifiuti suscettibili, dopo l'eliminazione, di dare origine in qualche modo a un'altra sostanza, per esempio a un prodotto di lisciviazione avente una delle caratteristiche elencate da H1 a H 14.
- **Codice CER**: codice a sei cifre identificativo della tipologia di rifiuto, così come indicato dal Catalogo Europeo dei Rifiuti (Allegato D al Decreto Legislativo 3 Dicembre 2010 n. 250).
 - I livello (prime 2 cifre): categorie industriali e/o attività che generano rifiuti;
 - II livello (seconde 2 cifre): riguarda specifici processi all'interno delle categorie;
 - III livello (ultime 2 cifre): specifica ogni singola tipologia di rifiuto.

Per esempio:

- 18 01 01: oggetti da taglio (bisturi, rasoi);
- 18 01 02: parti anatomiche e organi, sacche per plasma, sostanze per conservazione del sangue.

- **Registro di carico e scarico** (art. 190 del D. Lgs. n. 152/2006 e successive modifiche). Registro su cui vanno annotati tutti i carichi e gli scarichi di rifiuti, che garantisce la tracciabilità del flusso dei rifiuti nelle varie fasi del trasporto, dal produttore/detentore al sito di destinazione. In regime SISTRI, tale documento è sostituito dal registro cronologico e le schede di movimentazione (SISTRI), che sono resi disponibili all'autorità di controllo in qualsiasi momento ne faccia richiesta e sono conservate in formato elettronico da parte del soggetto obbligato per almeno tre anni dalla rispettiva data di registrazione o di movimentazione dei rifiuti.
- **SISTRI sistema informatico di controllo e della tracciabilità dei rifiuti** (legge n. 102 del 2009; e art. 16 Decreto Legislativo 3 Dicembre 2010). Permette di monitorare in tempo reale tutta la filiera dei rifiuti, la cui gestione è stata affidata al Comando Carabinieri per la Tutela dell'Ambiente. I documenti relativi devono essere conservati per almeno tre anni.
- **ADR**: acronimo di "*Accord european relatif au transport international des marchandises dangereuses par route*", cioè "Accordo europeo relativo ai trasporti internazionali di merci pericolose su strada". Tale accordo vale anche sul Territorio Nazionale. Il trasporto su strada delle merci e sostanze pericolose è regolamentata dall'ADR, il cui testo è aggiornato ogni due anni.
- Il **trasporto di rifiuti pericolosi**, oltre alle previsioni di legge nazionali, è rimandato, tramite l'art. 265 D. Lgs. 152/2006 e ss.mm.ii (incluso il Decreto legislativo 3 dicembre 2010, n. 205), alle norme e regolamenti internazionali delle merci pericolose.

L'ADR raggruppa le merci pericolose e i rifiuti in relazione al tipo di pericolo che essi presentano, e le divide in classi contraddistinte da una numerazione progressiva.

- Classe 1: Materie ed oggetti esplosivi;
- Classe 2: Gas compressi, liquefatti o disciolti sotto pressione;
- Classe 3: Materie liquide infiammabili;
- Classe 4.1: Solidi infiammabili;
- Classe 4.2: Materie soggette ad accensione spontanea;
- Classe 4.3: Materie che a contatto con l'acqua sviluppano gas infiammabili;
- Classe 5.1: Materie comburenti;
- Classe 5.2: Perossidi organici;
- Classe 6.1: Materie tossiche;
- Classe 6.2: Materie infettanti;
- Classe 7: Materie radioattive;
- Classe 8: Materie corrosive;
- Classe 9: Materie e oggetti pericolosi diversi.

- **Numero ONU**, di 4 cifre, associato univocamente alla singola sostanza o gruppo. Identifica con l'ADR ogni sostanza o materia pericolosa o rifiuto.

1.8 Gestione dei rifiuti di laboratorio

La gestione dei rifiuti di un laboratorio microbiologico è un aspetto che deve essere attentamente valutato, osservando scrupolosamente le procedure previste dalle norme di sicurezza. Tutti i materiali che residuano dalle procedure eseguite nel laboratorio microbiologico (colture in piastra o in provetta sia in terreno solido sia liquido ecc.) devono essere smaltiti dopo sterilizzazione negli appositi contenitori. Reagenti e soluzioni da eliminare vanno smaltiti dopo trasferimento in contenitori destinati a questo specifico impiego. Occorre prestare la massima attenzione in queste operazioni, per evitare ogni rischio di contaminazione e lo sviluppo di possibili reazioni chimiche impreviste.

Rifiuti speciali sanitari a rischio infettivo

Per “rifiuto speciale sanitario a rischio infettivo” si intende qualunque rifiuto proveniente da operazioni che abbiano avuto contatto con **materiale infetto o potenzialmente infetto**: rifiuti provenienti da qualunque manipolazione con prodotti biologici (liquidi biologici, colture cellulari, animali provenienti da laboratori ecc.). La manipolazione dei rifiuti di tipo sanitario richiede, quindi, le stesse cautele richieste durante la normale attività di laboratorio e

La classificazione dei rifiuti

(Fonte: Ministero dell'Ambiente)

I rifiuti sono classificati in base all'origine in:

- **rifiuti urbani** (domestici, di strade e aree pubbliche);
- **rifiuti speciali**.

Secondo le caratteristiche, invece, in:

- **rifiuti pericolosi**;
- **non pericolosi**.

I rifiuti speciali

- Rifiuti industriali
- Rifiuti da attività commerciali
- Rifiuti derivanti dall'attività di recupero e smaltimento di rifiuti, fanghi prodotti da trattamenti delle acque e dalla depurazione delle acque reflue e da abbattimento di fumi
- Rifiuti derivanti da attività sanitarie
- Macchinari e apparecchiature deteriorati e obsoleti
- Veicoli a motore, rimorchi e simili fuori uso e loro parti

I rifiuti urbani pericolosi (RUP)

Rifiuti di origine civile, ma con elevata presenza di sostanze inquinanti: i principali sono i medicinali

scaduti e le pile. Come tali, devono essere gestiti secondo procedure diverse dai rifiuti urbani “normali”.

I rifiuti speciali pericolosi

(precedentemente definiti come tossico-nocivi)

I rifiuti speciali pericolosi sono quei rifiuti generati dalle attività produttive che contengono al loro interno un'elevata dose di sostanze inquinanti, quali:

- raffinazione del petrolio;
- processi chimici;
- industria fotografica;
- industria metallurgica;
- oli esauriti;
- solventi;
- produzione conciaria e tessile;
- impianti di trattamento dei rifiuti;
- ricerca medica e veterinaria.

Fra i rifiuti speciali pericolosi rientrano quelli sanitari a rischio infettivo e quelli che presentano altri rischi (per es. tossici, nocivi, corrosivi, irritanti), i medicinali citotossici e citostatici dal settore sanitario o veterinario o da attività di ricerca collegate che richiedono particolari sistemi di gestione.

dipenderà dalla classe di rischio dei microrganismi in termini di infettività, patogenicità e trasmissibilità (D. Lgs. 81/08). Le classi in cui vengono suddivisi i microrganismi sono 4, come abbiamo visto.

A ogni classe corrispondono caratteristiche di contenimento previste dalla normativa sulla sicurezza; le medesime devono essere osservate anche per i rifiuti, fino alla loro inattività con mezzi fisici o chimici. Al fine di minimizzare il potenziale rischio infettivo, i rifiuti sanitari possono subire, ove necessario, un “trattamento di sterilizzazione” prima di essere allontanati dai luoghi di produzione per avviarli a smaltimento.

In ogni caso, lo smaltimento delle colture microbiologiche prevede che queste siano sempre sterilizzate in autoclave prima dell'eliminazione.

In ambito europeo è stabilito che le autoclavi operino con i seguenti tempi di sterilizzazione:

- **6-8 minuti a 134 °C**
- **15-20 minuti a 121 °C**

Poiché è emerso che la completa inattivazione delle spore di *Bacillus stearothermophilus* richiede un trattamento a 121 °C per 90 minuti o a 126° per 15 minuti e tenendo conto che spesso i rifiuti provenienti da laboratori microbiologici vengono sterilizzati in contenitori di acciaio con carichi di vari chilogrammi di peso, appaiono idonee le seguenti combinazioni tempo/temperatura:

- **121 °C per 40-45 minuti**
- **134 °C per 15-20 minuti**

Rifiuti di origine chimica

Rifiuti speciali non pericolosi e pericolosi a rischio chimico

In tale categoria di rifiuti speciali non pericolosi e pericolosi a rischio chimico sono ricompresi sia i rifiuti solidi che i rifiuti liquidi; ovviamente le modalità di confezionamento (tipologia di imballo) per le due tipologie di rifiuti sono differenti.

Smaltimento dei rifiuti pericolosi di origine chimica

1. La gestione dei rifiuti è regolamentata in tutte le sue fasi, raccolta, deposito temporaneo, trasporto e smaltimento, dal **Decreto Legislativo 22/97** e dalle sue successive modifiche e integrazioni, che impongono una serie di procedure per l'eliminazione dei rifiuti speciali, sia pericolosi che non pericolosi.
2. Nessun rifiuto chimico può essere eliminato attraverso le fognature, i rifiuti solidi urbani, i rifiuti assimilabili agli ospedalieri o immesso in diversa forma nell'ambiente. Si ricorda, inoltre, che negli scarichi possono avvenire pericolose miscele tra sostanze chimiche eliminate da diversi laboratori.
3. Lo smaltimento dei rifiuti chimici deve essere predisposto secondo le procedure di seguito riportate:

1 IL LABORATORIO MICROBIOLOGICO

Diverse tipologie di contenitori per lo smaltimento di rifiuti pericolosi.



- assicurarsi di conoscere tutte le caratteristiche e le compatibilità delle sostanze chimiche utilizzate in modo da prevedere il tipo di rifiuto che sarà prodotto e le modalità di raccolta del medesimo;
 - usare adeguate misure di protezione, individuali e collettive (camici, guanti, mascherine, occhiali), in tutte le fasi della manipolazione del rifiuto;
 - tenere separati i composti alogenati da quelli non alogenati (sono considerati rifiuti alogenati quelli che contengono una concentrazione di alogeni superiore allo 0,5%).
4. I contenitori per i rifiuti devono sempre riportare indicato molto chiaramente il contenuto. È vietato aggiungere sostanze in un recipiente di cui non si possa risalire al contenuto, così come lasciare o mantenere in uso contenitori non contrassegnati.
 5. I rifiuti tossico-nocivi non devono essere tenuti nel laboratorio più del necessario, per ragioni di sicurezza.
 6. La quantità dei rifiuti infiammabili tenuti in laboratorio deve essere comunque molto limitata.

1.9 Organizzazione delle attività di laboratorio

Il laboratorio di microbiologia lavora con organismi viventi che, contrariamente alle sostanze chimiche, possono spesso mostrare reazioni inaspettate con un notevole ambito di variabilità. Di questo occorre tenere sempre debito conto, cercando di operare continuamente con la massima precisione e seguendo un percorso logico e conosciuto, per non introdurre altri fattori che possono interferire con la correttezza del risultato finale e per evitare inutili rischi agli operatori. Si dovrà quindi:

- individuare e predisporre prima di procedere all'analisi il percorso più adatto al raggiungimento degli obiettivi prefissati;
- conoscere perfettamente la metodica da eseguire, nonché i relativi presupposti teorici;
- essere in grado di interpretare i risultati ottenuti e di valutare se ripetuti risultati al di fuori di un certo intervallo (*range*) di tollerabilità siano o meno da imputare a errori esecutivi o a malfunzionamenti della strumentazione utilizzata;
- approntare un idoneo e continuo sistema di controllo di qualità ed essere in grado di compilare, se richiesta, una relazione scritta.

1.10 Stesura di una relazione di laboratorio

Una relazione di laboratorio rappresenta un "report" che illustra in modo chiaro e comprensibile le operazioni svolte, con l'indicazione dei punti fondamentali.

Dall'esame della relazione (che costituisce anche un buon metodo di autovalutazione) deve risultare che chi ha eseguito l'esperienza di laboratorio:

- ha compilato la relazione con un linguaggio chiaro e sintetico, con l'impiego di una corretta terminologia scientifica;
- ha compreso chiaramente gli scopi dell'esperienza;
- ha eseguito in modo logico e corretto le operazioni necessarie al loro raggiungimento;
- è in grado di spiegarne in modo dettagliato ogni aspetto particolare;
- ha osservato in ogni fase della procedura le norme di sicurezza previste;
- è in grado di applicare la tecnica appresa a casi analoghi.

È opportuno descrivere le procedure seguite non in prima persona, facendo sempre riferimenti precisi e non generici e seguendo un ordine logico nell'elencare la sequenza delle operazioni compiute. Si tenga conto che gli articoli che compaiono nelle riviste scientifiche, corredati in apertura di un *abstract* che riassume in breve l'oggetto della ricerca e i risultati conseguiti, seguono una impostazione simile.

La sequenza corretta delle parti che devono essere presenti in un articolo scientifico, elencata di seguito, può costituire un modello per eventuali report da produrre non solo nel prosieguo degli studi di carattere tecnico-scientifico, ma anche nei settori più disparati dell'attività lavorativa:

- **titolo** dell'esperienza condotta in laboratorio;
- **introduzione**, ossia una presentazione del lavoro svolto; contiene l'indicazione della materia e dell'argomento della prova, di chi ha condotto l'esperienza (singolo esecutore o gruppo), della data di esecuzione;
- **obiettivi** della prova;
- **principio** su cui si basa il metodo impiegato per lo svolgimento dell'esperienza; può essere utile illustrare, in breve, anche il principio di funzionamento della strumentazione utilizzata;
- **materiali, strumenti, terreni di coltura, reagenti** utilizzati;
- **procedimento**, con il quale si illustrano tutte le fasi operative in modo logico e ordinato, sulla base del protocollo indicato dalla metodica utilizzata; è preferibile organizzare l'esposizione in forma schematica come successione di punti, allegando anche i calcoli eventualmente effettuati;
- **osservazione e raccolta dei dati** dall'esperienza condotta, organizzati possibilmente in tabella; se si tratta di valori numerici, è fondamentale indicare le unità di misura; diversamente, può trattarsi di definire il risultato come negativo o positivo o in altre modalità; se sono state effettuate prove di controllo, se ne deve indicare il risultato;
- **interpretazione dei dati e conclusioni**; l'analisi critica dei risultati ottenuti permette di esprimere una valutazione in merito alla rispondenza con i valori attesi o gli obiettivi della prova; si verifica, per esempio, se i risultati rientrano nel range di tolleranza (valori normali) o ne sono al di fuori; si possono fare considerazioni sui microrganismi isolati esprimendo eventuali dubbi o incertezze sulla loro precisa identificazione; si indica l'opportunità di effettuare ulteriori e più specifiche ricerche.