

E. Cavallari, L. de Lellis, G.P. Stefanelli, T. Lorenzini

## Il rischio biologico nei laboratori biologici e chimici non sanitari

HERA SpA - Laboratorio Unità Bologna - Settore Biologico

**RIASSUNTO.** Il titolo VIII del D.Lgs 626/94, riguardante il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro, introduce la necessità della valutazione del rischio biologico. Nell'ambito dei laboratori chimici e biologici non sanitari il personale è soggetto a rischio biologico sia per esposizione potenziale ad agenti biologici che potrebbero essere presenti nelle matrici che giungono in analisi, sia per uso deliberato di microrganismi. Tuttavia la valutazione dei risultati dei monitoraggi dell'aria e delle superfici in tali ambienti risulta ancora difficoltosa in quanto non esistono linee guida che indichino livelli di esposizione e di contaminazione accettabili e limiti precisi di riferimento cui attenersi per giudicare la "salubrità" di un ambiente. Il seguente lavoro descrive una campagna di monitoraggio per la valutazione del rischio biologico eseguita presso i Laboratori del Gruppo HERA: esso vuole fungere da stimolo per la stesura di linee guida dedicate a questi particolari ambienti di lavoro e per arrivare ad una standardizzazione delle procedure di campionamento e di valutazione della qualità dell'aria.

**Parole chiave:** rischio biologico, qualità microbiologica dell'aria, laboratori biologici e chimici non sanitari, microrganismi aerodiffusi.

**ABSTRACT.** The D.Lgs 626/94, regarding the improvement of workers safety in the workplace, introduces the necessity of the biological hazards assessment.

In case of not sanitary chemical and biological laboratories, workers are subject to biological hazards due to potential exposure, because many biological agents could be present in the samples to be analysed, and also for deliberated use of micro organisms.

However the assessment of the air and surfaces monitoring results in such environment is still difficult without Guidelines that indicate levels of acceptable exposure and contamination, and reference limits in order to judge "safe" the environment. The following report describes a microbiological monitoring into the Laboratories of HERA SpA and wants to underline the need to produce Guidelines dedicated to these particular workplaces environment, in order to standardize air quality sampling procedures and results assessment.

**Key words:** biological risk, microbiological air quality, not sanitary biological and chemical laboratories, airborne microorganisms.

### Introduzione

Il concetto di rischio biologico e la necessità di fornire una valutazione da parte del datore di lavoro vengono introdotti dal D.Lgs.626/94, il quale dedica il Titolo VIII alla protezione da agenti biologici (1). Questi vengono definiti come "qualsiasi microrganismo che può provocare infezioni, allergie o intossicazioni" (art. 74) e classificati in quattro gruppi (art. 75) in base alla valutazione delle loro proprietà allergeniche, tossigeniche e di pericolosità, quali *infettività*, *patogenicità*, *trasmissibilità* e *neutralizzabilità*.

Il campo di applicazione del titolo VIII comprende tutte le attività che possono comportare rischio di esposizione ad agenti biologici, sia quelle con uso deliberato di microrganismi che quelle con rischio potenziale di esposizione. La differente tipologia di rischio espositivo condiziona gli adempimenti, delineati nei diversi articoli, che il datore di lavoro deve adottare.

Nell'ambito dei laboratori chimici e biologici non sanitari il personale è soggetto a rischio biologico sia per esposizione potenziale ad agenti biologici che potrebbero essere presenti nelle matrici analizzate, sia per utilizzo deliberato di microrganismi durante le fasi analitiche. Inoltre nell'aria si possono concentrare numerosissime particelle e specie microbiche per la presenza di apparecchiature ed impianti di riscaldamento e di condizionamento dell'aria (2).

Per quanto riguarda in particolare l'ambiente "laboratori", l'EA-04/10 "Accreditamento per i laboratori di microbiologia", che integra la UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura", prevede un monitoraggio della contaminazione microbica aerea e di superficie che utilizzi campionatori d'aria e piastre a contatto, al fine di descrivere l'andamento dei livelli di contaminazione e verificare l'adeguatezza degli ambienti allo svolgimento delle analisi.

La ricerca dei microrganismi vitali aerodispersi negli ambienti di laboratorio può essere utilizzata per valutarne lo stato igienico e per determinare le eventuali fonti di contaminazione che possono inficiare le analisi; inoltre aiuta a selezionare appropriate misure preventive e correttive atte ad evitare contaminazioni pericolose per il personale e a valutare il funzionamento degli impianti di condizionamento e l'efficienza dei dispositivi di filtrazione dell'aria.

Il controllo microbiologico delle superfici, che giocano un ruolo fondamentale nella contaminazione crociata, serve invece per verificare l'efficacia delle operazioni di pulizia e disinfezione, accertare la qualità ed il corretto impiego di detergenti e disinfettanti e verificare l'addestramento alla corretta prassi igienica del personale di laboratorio.

Tuttavia la determinazione della qualità dell'aria in funzione della valutazione del rischio biologico e l'interpretazione dei risultati delle indagini microbiologiche risulta ancora oggi di difficile realizzazione per una serie di difficoltà, tra cui l'assenza di riferimenti utilizzabili quali "valori-soglia" di esposizione.

Per la maggioranza degli ambienti di lavoro risultano ancora assenti linee guida che indichino livelli di esposizione e di contaminazione accettabili e limiti precisi di riferimento cui attenersi per giudicare la "salubrità" di un ambiente. Esistono infatti in letteratura numerosi riferimenti e linee guida sulle buone prassi di laboratorio (BPL) (3)(4)(5)(6)(7)(13)(17) e sulle procedure di disinfezione e di emergenza da adottare (8), ma poco si conosce relativamente ai controlli da effettuarsi ai fini della valutazione quali-quantitativa dell'aria e delle superfici in tali ambienti di lavoro.

La scelta dei parametri da analizzare per la valutazione del grado di biocontaminazione dell'aria degli ambienti di laboratorio viene attuata in base alle indicazioni desunte dalla bibliografia nazionale ed internazionale, il cui superamento non implica però automaticamente l'instaurarsi di condizioni di rischio.

Come riferimenti e indicazioni di massima si possono considerare:

- i valori proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per l'ambiente "Laboratori" in ambiente ospedaliero (carica microbica compresa tra 200 e 500 Unità Formanti Colonie(UFC) /m<sup>3</sup> d'aria) (9);
- i valori proposti nel 1993 dalla commissione delle comunità europee (European Collaborative Action) per gli ambienti indoor non industriali, con fasce orientative di contaminazione dell'aria esposti nelle tabelle I e II (8).

**Tabella I. Categorie di contaminazione batterica dell'aria (Report N. 12, European Collaborative Action)**

CATEGORIA DI INQUINAMENTO MICROBIOLOGICO (BATTERI)	ABITAZIONI (UFC/m <sup>3</sup> )	AMBIENTI NON INDUSTRIALI (UFC/m <sup>3</sup> )
molto bassa	<100	<50
bassa	<500	<100
intermedia	<2500	<500
alta	<10000	<2000
molto alta	> 10000	> 2000

**Tabella II. Categorie di contaminazione micetica dell'aria (Report N. 12, European Collaborative Action)**

CATEGORIA DI INQUINAMENTO MICROBIOLOGICO (MICETI)	ABITAZIONI (UFC/m <sup>3</sup> )	AMBIENTI NON INDUSTRIALI (UFC/m <sup>3</sup> )
molto bassa	<50	<25
bassa	<200	<100
intermedia	<1000	<500
alta	<10000	<2000
molto alta	>10000	> 2000

- i valori proposti dall'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) per la carica micotica nell'aria indoor (Tabella III) (10).
- i limiti proposti al 56° Congresso Nazionale SIMLII per la carica mesofila totale (Tabella IV) (10).
- gli "indici di contaminazione microbiologica" proposti dal prof. Dacarro dell'Università di Pavia, che correlano le cariche batteriche e fungine ambientali ad un giudizio sulla qualità dell'aria (tabella V) (11) (16):
  - l'**IGCM** (Indice Globale di Contaminazione Microbica) che viene utilizzato per la misura complessiva dell'inquinamento microbico ambientale  

$$\text{IGCM} = \text{UFC/batteri}(37^{\circ}\text{C}) + \text{UFC/batteri}(20^{\circ}\text{C}) + \text{UFC/miceti}(20^{\circ}\text{C})$$
  - l'**ICM** (Indice di Contaminazione da Batteri Mesofili) che consente di valutare il contributo all'inquinamento da parte di batteri di origine umana e animale;  

$$\text{ICM} = \text{UFCbat}(37^{\circ}\text{C}) / \text{UFCbat}(20^{\circ}\text{C})$$

**Tabella III. Concentrazione fungina e qualità dell'aria indoor (ACGIH)**

QUALITÀ ARIA INDOOR	CONCENTRAZIONE MICETI (UFC/m <sup>3</sup> )
buona	<100
intermedia	100 - 1000
scadente	>1000

**Tabella IV. Carica mesofila totale e livello della qualità dell'aria (56° Congresso Nazionale SIMLII)**

LIVELLO QUALITÀ ARIA	CARICA MESOFILA TOTALE (UFC/ m <sup>3</sup> )
molto basso	<50
basso	50-100
medio	101-500
alto	501-2000
molto alto	> 2000

**Tabella V. Indici di contaminazione microbica dell'aria (Dacarro e collaboratori)**

Categoria	IGCM/m <sup>3</sup>	Classe			
Molto bassa	< 500				
Bassa	< 1000				
Intermedia	> 1000	A:	IGCM > 1000	ICM < 3	IA < 3
		B:	IGCM > 1000	ICM > 3 o	IA > 3
		C:	IGCM > 1000	ICM > 3	IA > 3
Alta	> 5000	D:	IGCM > 5000	ICM < 3	IA < 3
		E:	IGCM > 5000	ICM > 3 o	IA > 3
		F:	IGCM > 5000	ICM > 3	IA > 3
Molto alta	> 10000	G:	IGCM > 10000	ICM < 3	IA < 3
		H:	IGCM > 10000	ICM > 3 o	IA > 3
		I:	IGCM > 10000	ICM > 3	IA > 3

- l'IA (indice di amplificazione) che permette di analizzare le differenze tra i livelli di contaminazione esterni e quelli interni.

$$IA = IGCM(\text{interno}) / IGCM(\text{esterno})$$

---

## Obiettivo del lavoro

HERA (Holding Energia Risorse Ambiente) gestisce i servizi legati all'utilizzo delle risorse energetiche, quelli legati al ciclo dell'acqua (potabilizzazione, depurazione, fognatura) nonché i servizi ambientali che comprendono l'intero ciclo di recupero e riciclaggio della materia, la raccolta e il trattamento dei rifiuti, l'igiene urbana, la termovalorizzazione ed il compostaggio.

In particolare i servizi di acquedotto gestiti da HERA comprendono le fasi di: captazione delle acque dalla fonte di approvvigionamento, trattamento di potabilizzazione delle acque prelevate, adduzione dell'acqua potabile alla rete di distribuzione e la distribuzione dell'acqua potabile agli utenti tramite un sistema di serbatoi e di condotte.

In tali ambiti si inserisce l'attività di controllo analitico operato dai Laboratori Hera, dislocati nelle province di Bologna, Ravenna, Rimini, Forlì-Cesena, Ferrara e Modena. Tali laboratori sono deputati alla ricerca dei parametri richiesti dalle normative nazionali e/o regionali, in particolare dal D.Lgs.31/01 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano" integrato dal D.Lgs.n.27/2002 e dal D.Lgs.152/99 concernente la tutela delle acque dall'inquinamento, integrato dal D.Lgs. n.258/2000".

Ciò comporta che i campioni da analizzare nei vari laboratori siano variabili sia per matrice (acque potabili e superficiali, scarichi reflui e industriali, fanghi di depurazione...) che per provenienza.

I Laboratori Hera dal 2005 hanno intrapreso un programma di monitoraggio nei locali di laboratorio deputati alle analisi microbiologiche, così come richiesto dalla ISO 17025 (12), per la garanzia dei requisiti ambientali necessari per l'esecuzione delle analisi secondo le procedure di qualità; il programma di controllo ambientale ha avuto lo scopo di raccogliere dati oggettivi per ridurre al minimo le contaminazioni negli spazi adibiti alle prove analitiche microbiologiche e per verificare l'efficacia delle restrizioni imposte a queste aree.

Al fine di effettuare una più idonea valutazione dei rischi e dell'efficacia delle procedure di prevenzione, la Direzione Laboratori nel 2006 ha realizzato un più articolato piano di monitoraggio degli ambienti di lavoro, ampliandolo a tutte le zone potenzialmente esposte ad agenti biologici (laboratori biologici e chimici, aree di lavaggio/sterilizzazione e di ricevimento/accettazione campioni).

Con la pubblicazione dei risultati ottenuti nelle campagne di monitoraggio ambientali si vuole portare un contributo a chi si occupa, per motivi di sicurezza e/o qualità, di ambienti di laboratorio analisi non sanitari; contemporaneamente si vuole sensibilizzare gli enti preposti sulle problematiche inerenti le procedure di monitoraggio biologico e sull'interpretazione dei risultati ottenuti. La raccolta

dei risultati dei monitoraggi effettuati dai laboratori italiani in conformità alla ISO 17025 potrebbe fungere da banca dati e servire per la stesura di linee guida dedicate a questi particolari ambienti di lavoro, per arrivare ad una standardizzazione delle procedure di campionamento e di valutazione della qualità dell'aria.

---

## Materiali e metodi

### Attività dei laboratori HERA

L'indagine ha riguardato i laboratori biologici e chimici, le aree di lavaggio/sterilizzazione e di ricevimento/accettazione campioni.

L'attività svolta dai Laboratori HERA si può suddividere nelle seguenti fasi:

1. Campionamento: raccolta dei campioni da analizzare nei punti di rete di distribuzione o presso gli impianti di potabilizzazione delle acque superficiali, di depurazione delle acque reflue, di compostaggio, di trattamento rifiuti.
2. Ricevimento/accettazione: consegna dei campioni ai laboratori di competenza, loro inserimento nel Data Base dei Laboratori HERA, distribuzione ai vari settori analitici.
3. Analisi: svolgimento delle analisi specifiche in ogni settore di competenza (Biologia, Chimica Reflue, Chimica Potabile).
4. Lavaggio/sterilizzazione: preparazione, tramite anche disinfezione ed eventuale sterilizzazione, della vetreria e del materiale necessario per le analisi da parte di apposito personale.

I laboratori HERA sono stati distinti rispetto al tipo di gestione e controllo delle attività analitiche svolte e, di conseguenza, anche le frequenze e le tipologie di campionamento sono state diversificate:

- i laboratori accreditati hanno monitorato mensilmente i locali deputati alle analisi microbiologiche e semestralmente gli altri locali;
- i laboratori non accreditati hanno monitorato semestralmente tutti i locali interessati all'esposizione ad agenti biologici.

Con la stessa frequenza sono state controllate le superfici dei banchi di lavoro prima e dopo le operazioni di pulizia e di disinfezione.

### Monitoraggio dell'aria negli ambienti di laboratorio

Per il controllo microbiologico dell'aria sono stati utilizzati i campionatori di bioaerosol SAS Super 100 e SAS (International PBI) a piastra di contatto, che utilizzano il principio dell'impatto su una superficie di terreno nutritivo agarizzato; essi aspirano l'aria attraverso il coperchio a fori speciali del campionatore, generando un flusso d'aria laminare. In tal modo i microrganismi presenti nell'aerosol vengono trascinati sulla piastra contenente il terreno di coltura specifico per la loro crescita.

Dopo l'aspirazione le piastre sono state incubate per i tempi ed alle temperature idonee per lo sviluppo dei microrganismi ricercati: al termine del periodo di incubazione sono state identificate e conteggiate le colonie di batteri e miceti. Per avere dati comparabili tra loro i risultati sono stati riportati al volume di 1 m<sup>3</sup> di aria, esprimendo il risultato finale in UFC (Unità Formanti Colonie)/m<sup>3</sup>.

### Monitoraggio delle superfici negli ambienti di laboratorio

Per la valutazione del grado di contaminazione delle superfici è stata utilizzata la tecnica di campionamento con piastra a contatto.

Con questo metodo le piastre con fondo quadrettato, contenenti terreno agarizzato convesso verso l'esterno, vengono messe a contatto con la superficie da analizzare e successivamente incubate alle opportune temperature e per i tempi necessari allo sviluppo delle colonie dei microrganismi ricercati. Dopo la conta delle colonie i risultati sono stati espressi come UFC/cm<sup>2</sup>.

### Parametri scelti per il monitoraggio

Oltre alla carica microbica totale e alla carica micetica, si è scelto di inserire nel monitoraggio anche indicatori di contaminazione fecale e patogeni (14) ricercati nelle analisi batteriologiche di routine e/o potenzialmente presenti nei campioni analizzati, così da rilevare possibili contaminazioni crociate ed ambientali.

Si sono presi pertanto in considerazione, come parametri da analizzare, i seguenti agenti biologici:

- **Conte totali a 37°C (carica mesofila):** indica una contaminazione di origine umana o animale e può includere anche patogeni convenzionali. Il terreno di coltura utilizzato è il TSA (Tryptic Soy Agar).
- **Conte totali a 22°C (carica psicrofila):** indica una generica contaminazione batterica ambientale ad opera di germi che vivono a spese della sostanza organica in decomposizione ed in genere negli ambienti umidi. Il terreno di coltura utilizzato è il TSA (Tryptic Soy Agar).
- **Miceti (lieviti e muffe) -** Microrganismi aerobi, eterotrofi, unicellulari o filamentosi, indicatori generici di contaminazione in quanto largamente diffusi nell'ambiente; un'alta concentrazione è spesso correlata ad elevata umidità e polverosità, ridotta ventilazione e scarsa qualità dell'aria. È stata effettuata, nell'ambito della ricerca dei miceti, l'identificazione di *Aspergillus niger* che può provocare allergie respiratorie. Il terreno di coltura utilizzato è il SDA (Sabouraud Dextrose Agar).
- ***Escherichia coli*** - Enterobatteri Gram negativi indicatori di contaminazione fecale appartenenti alla classe 2 di pericolosità secondo il D.Lgs 626/94 (art. 75, comma 3). Il terreno di coltura utilizzato è il CHROMagar E.coli.
- ***Enterococchi*** - Cocchi Gram positivi importanti perché più resistenti dei coliformi. Sono indicatori di inquinamento fecale. Appartengono alla classe 2 di pericolosità secondo il D.Lgs 626/94 (art. 75, comma 3). Il terreno di coltura utilizzato è l'Aesculin Bile Azide Agar.

- ***Staphylococcus aureus*** - Specie patogena appartenente agli Stafilococchi, cocchi Gram positivi, normalmente presenti sulla cute e a livello del tratto naso-faringeo dell'uomo. Appartengono alla classe 2 di pericolosità secondo il D.Lgs 626/94 (art. 75, comma 3). Il terreno di coltura utilizzato è il Baird Parker Agar.
- ***Salmonella spp.*** - Enterobatteri patogeni indicatori di contaminazione fecale. Appartengono alla classe 2 di pericolosità secondo il D.Lgs 626/94 (art. 75, comma 3). Il terreno di coltura utilizzato è l'Hektoen Enteric Agar.

---

### Risultati

I risultati riferiti alle cariche batteriche e micotiche che potevano essere utilizzati per il calcolo degli indici IGCM e ICM sono stati raggruppati in tabelle riassuntive specifiche per le diverse attività individuate:

- Locali in cui si svolgono analisi microbiologiche (tabelle VI e VII)
  - Locali in cui si svolgono analisi chimiche su acque potabili (tabella VIII)
  - Locali in cui si svolgono analisi chimiche su acque reflue, compost o rifiuti (tabella IX)
  - Locali di lavaggio vetreria e/o sterilizzazione (tabella X)
  - Locali deputati al ricevimento e smistamento campioni (tabella XI)
  - Altri locali (tabella XII)
- Informazioni relative ad altri risultati sono rappresentate mediante istogrammi (figg. 1-8).

---

### Discussione

#### A - Qualità dell'aria

Nei monitoraggi effettuati non sono mai stati rilevati indicatori di contaminazione fecale e patogeni, quali *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* L'unica eccezione è la presenza di enterococchi nella Sala 10 del laboratorio di Ravenna, adibita sia ad ufficio che a laboratorio; probabilmente proprio questa doppia funzione fa sì che tale ambiente non venga recepito dagli utilizzatori come laboratorio e quindi non venga pulito adeguatamente, anche se le matrici trattate sono potenzialmente contaminate.

Per una valutazione più immediata dei risultati degli altri parametri ricercati (contaminazione batterica psicrofila e mesofila e contaminazione fungina), ci si è riferiti all'indice IGCM proposto dal prof. Dacarro (tabella V) che classifica la contaminazione dell'aria in 5 categorie: molto bassa, bassa, intermedia, alta e molto alta.

Non è stato possibile calcolare ed effettuare la valutazione dell'indice di amplificazione IA (IGCM(interno) / IGCM(esterno)), che permette di analizzare le differenze tra i livelli di contaminazione esterni ed interni, in quanto non sono stati eseguiti in modo continuativo campionamenti all'esterno dei laboratori.

**Tabella VI. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali in cui si svolgono analisi microbiologiche su acque potabili**

SETTORI MICROBIOLOGIA POTABILI	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
BOLOGNA	apr-06	8	53	100	161	0,150	molto bassa
	mag-06	47	322	255	624	0,146	bassa
	giu-06	33	30	33	96	1,1	molto bassa
	lug-06	5	55	44	104	0,090	molto bassa
	ago-06	33	47	17	97	0,702	molto bassa
	set-06	17	19	5	41	0,894	molto bassa
	ott-06	22	11	11	44	2	molto bassa
	nov-06	5	28	17	50	0,178	molto bassa
	dic-06	5,5	11	0	16,5	0,5	molto bassa
RAVENNA	ott-06	210	530	650	1390	0,396	intermedia
	nov-06	1	150	240	391	0,006	molto bassa
	dic-06	90	70	50	210	1,285	molto bassa
FERRARA	ott-06	183	1983	1433	3599	0,092	intermedia
IMOLA	ott-06	8	48	18	74	0,166	molto bassa
RIMINI	dic-06	14	46	1	61	0,304	molto bassa
MODENA	ott-06	128	28	1250	1406	4,571	intermedia

LEGENDA TABELLE	
Molto bassa	< 500
Bassa	500 - 1000
Intermedia	1000 - 5000
Alta	5000 - 10000
Molto alta	> 10000

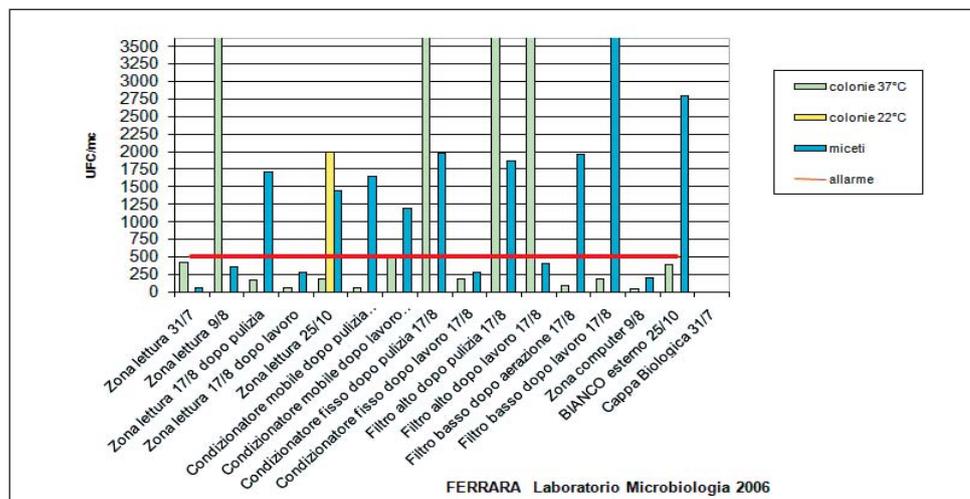
**Settori Analisi Microbiologiche o Biologiche di Acque Potabili**

Basandosi sui risultati di precedenti monitoraggi effettuati per il Sistema Qualità dal Laboratorio di Bologna, in linea con le indicazioni espresse nella Premessa, come criterio interno dei Laboratori HERA si considerano di norma accettabili valori di carica batterica e fungina <500 UFC/m<sup>3</sup>. La valutazione della categoria di contaminazione dell'aria secondo Dacarro ha permesso di confrontare tra loro i diversi punti analizzati nei diversi periodi dell'anno.

Nei locali deputati alle analisi microbiologiche delle acque potabili (tabella VI) i valori di carica batterica e fungina riscontrati sono generalmente al di sotto della concentrazione di 500 UFC/m<sup>3</sup>; anche la valutazione effettuata con l'IGCM evidenzia una categoria di contaminazione dell'aria bassa o molto bassa nell'80% dei casi. Tale risultato è probabilmente da imputare alla maggior consapevolezza del personale che lavora nel settore biologico sulla potenziale

pericolosità degli agenti presenti nelle matrici in analisi; ciò comporta maggiore attenzione alla disinfezione e agli accorgimenti per evitare contaminazioni ambientali.

La categoria di contaminazione è risultata intermedia solo in tre casi nei settori suddetti. La concentrazione riscontrata nel Laboratorio di Ravenna non è imputabile ad alcun motivo particolare ed è comunque rientrata nella norma nei monitoraggi successivi. Per quanto riguarda il laboratorio di Modena l'eccessiva concentrazione di miceti è probabilmente derivante da un'insufficiente separazione di tali locali dalla zona Accettazione (a sua volta esposta a contaminazioni dall'esterno). Nel laboratorio di Ferrara si nota la presenza di alte cariche psicrofile e micotiche nel campionamento effettuato in Ottobre (tabella VI), mentre nel periodo di Agosto, in cui non sono state ricercate le cariche psicrofile (figura 1), è presente una eccessiva concentrazione di carica mesofila, che indica contaminazione di origine umana e animale. Tali risultati sono stati utilizzati per richiamare l'attenzione del personale sul-



**Figura 1. FERRARA - Laboratorio Microbiologia agosto 2006**

l'importanza di isolare meglio l'ambiente di laboratorio (mantenendo finestre e porte chiuse), di effettuare una pulizia più attenta e di eliminare qualsiasi fonte di contaminazione del locale (es. piante decorative). La carica mesofila è comunque rientrata in valori accettabili nel campionamento effettuato in ottobre 2006 (tabella VI).

#### Settori di Analisi Microbiologiche o Biologiche di Acque Reflue

Una concentrazione più elevata della carica psicrofila, riscontrata nell'aria del locale adibito alle analisi microbiologiche di acque reflue e superficiali del settore di Bologna, rappresenta l'unico caso di classificazione dell'aria in categoria "intermedia" (tabella VII); tale campionamento risulta coincidente con il periodo della fioritura dei pioppi che circondano i locali e fa pensare ad una "contaminazione" dopo eventuale apertura di porte e finestre.

Per quanto riguarda il laboratorio di Ravenna si nota come la manipolazione di matrici fortemente contaminate causi in più punti una concentrazione elevata di miceti e carica psicrofila, che ha determinato una classificazione dell'aria in categoria "intermedia" nel campionamento di Ottobre (tabella VII). Nella zona deputata alla lettura delle piastre relative a campioni di tutte le matrici (potabili, superficiali e reflue) si è presentato l'unico caso di contaminazione in categoria "alta", accompagnata dalla presenza di *Aspergillus niger*. I valori sono comunque successivamente rientrati a livelli più che accet-

tabili, anche a seguito di opportuna informazione di tutto il personale sull'importanza della disinfezione di strumenti (contacolonie, ecc) e delle superfici e sulla necessità di isolare ed eliminare immediatamente il materiale infetto.

I laboratori di Modena e Imola presentano una buona qualità dell'aria.

#### Settori Analisi Chimiche di Acque Potabili

Il superamento nei locali di Ravenna del valore di 500 UFC/m<sup>3</sup> non compromette significativamente la qualità dell'aria che, secondo gli indici IGCM, si attesta su una categoria "intermedia" (tabella VIII).

#### Settori Analisi Chimiche di Acque Reflue

Il locale dedicato alle analisi chimiche delle acque reflue di Bologna evidenzia una concentrazione elevata sia di carica psicrofila che di miceti nell'aria (tabella IX), probabilmente dipendente dalla inadeguata separazione di tale area di laboratorio dall'esterno e/o dalle altre zone dello stesso edificio (figura 3).

Più rilevante la contaminazione riscontrata nel Locale Chimica Organica in cui è pratica abituale tenere aperte le finestre (vedi anche figura 4).

Interessanti sono i rilievi effettuati tra l'Agosto e l'Ottobre 2006 durante l'operazione di omogenizzazione che precede l'analisi chimica dei campioni di reflui, effettuata nel locale depurazione (figura 5). Tale operazione era stata identificata come rischiosa ed i risultati hanno effettiva-

Tabella VII. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali in cui si svolgono analisi microbiologiche su acque reflue

SETTORI MICROBIOLOGIA REFLUE	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
BOLOGNA	apr-06	39	147	144	330	0,265306	molto bassa
	mag-06	78	603	422	1103	0,129353	intermedia
	giu-06	125	164	217	506	0,762195	bassa
	lug-06	78	331	206	615	0,23565	bassa
	ago-06	58	275	161	494	0,210909	molto bassa
	set-06	136	417	300	853	0,326139	bassa
	ott-06	92	125	139	356	0,736	molto bassa
	nov-06	39	231	161	431	0,168831	molto bassa
	dic-06	31	150	78	259	0,206667	molto bassa
CAPPA CHIMICA RAVENNA	ott-06	220	580	660	1460	0,37931	intermedia
	nov-06	60	260	250	570	0,230769	bassa
ZONA LETTURE RAVENNA	ott-06	300	570	>5000	5870	0,526316	alta
	nov-06	60	450	280	790	0,133333	bassa
	dic-06	100	150	80	330	0,666667	molto bassa
ZONA MICROTOX RAVENNA	ott-06	100	560	690	1350	0,178571	intermedia
	nov-06	70	310	280	660	0,225806	bassa
	dic-06	160	200	70	430	0,8	molto bassa
RAVENNA	ott-06	280	850	830	1960	0,329412	intermedia
	nov-06	30	150	270	450	0,2	molto bassa
IMOLA	ott-06	26	40	30	96	0,65	molto bassa
REFLUE MODENA	ott-06	258	194	422	874	1,329897	bassa

Tabella VIII. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali in cui si svolgono analisi chimiche su acque potabili

SETTORE CHIMICO POTABILE	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
POTABILE SUPERFICIALI RAVENNA	ott-06	120	850	720	1690	0,141	intermedia
THM RAVENNA	ott-06	1000	230	140	1370	4,347	intermedia
IMOLA	ott-06	8	48	18	74	0,166	molto bassa

Tabella IX. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali in cui si svolgono analisi chimiche su acque reflue, compost o rifiuti

SETTORE CHIMICO REFLUE	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
REFLUE BOLOGNA	ott-06	264	3631	2289	6184	0,072	alta
ORGANICA BOLOGNA	ott-06	39	1558	856	2453	0,025	intermedia
ORGANICA BOLOGNA	ott-06	133	7261	7261	14655	0,018	molto alta
REFLUE RIMINI	dic-06	35	95	90	74	0,368	molto bassa
REFLUE RAVENNA	ott-06	1000	450	660	2110	2,222	intermedia
Sala 10 REFLUE RAVENNA	ott-06	30	560	580	1170	0,053	intermedia
METALLI RAVENNA	ott-06	40	650	1100	1790	0,061	intermedia
FANGHI RAVENNA	ott-06	140	420	850	1410	0,333	intermedia
THM RAVENNA	ott-06	1000	230	140	1370	4,347	intermedia
POT-SUP.REFLUE IMOLA	ott-06	26	40	30	96	0,65	molto bassa
STRUMENTALE IMOLA	ott-06	95	120	35	250	0,791	molto bassa
COMPOST RAVENNA	ott-06	90	550	480	1120	0,163	intermedia
REFLUE G105 MODENA	ott-06	67	147	350	1120	0,455	intermedia
REFLUE G110 MODENA	ott-06	311	103	172	1120	3,019	intermedia
RIFIUTI MODENA	ott-07	64	67	394	1120	0,955	intermedia

mente evidenziato l'apporto nell'ambiente di concentrazioni elevate di batteri psicrofili e mesofili; è stato quindi deciso di effettuare tale operazione sotto cappa aspirante.

Dalla figura 2, relativa al laboratorio di Ferrara, si evidenziano elevate concentrazioni di miceti nei locali Depurazione (Stanze 19 e 20), probabilmente dovute all'abitudine del personale di tenere le finestre parzialmente aperte.

#### Settori Lavaggio vetreria e Accettazione

Si sono rilevate elevate concentrazioni di cariche psicrofile nell'aria degli ambienti ausiliari

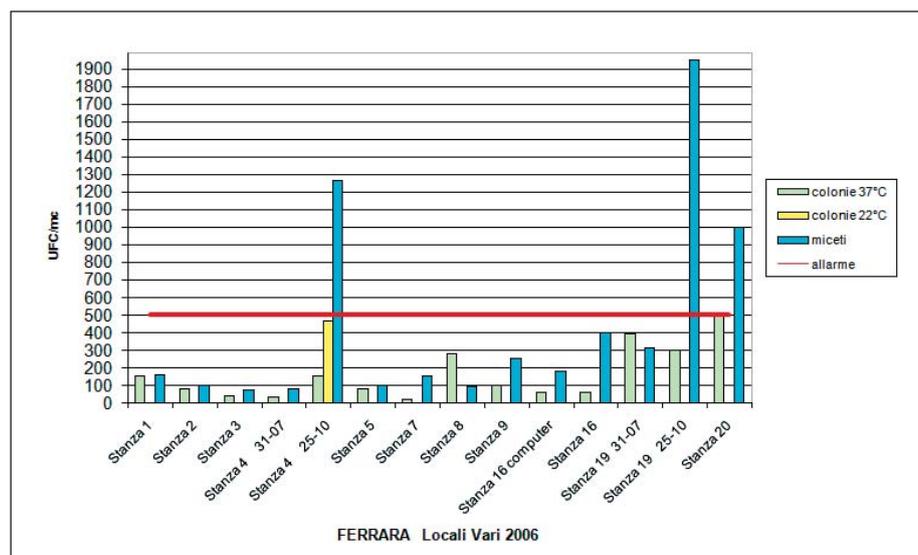


Figura 2. Concentrazione microbica nell'aria dei laboratori di Ferrara (\*) *Aspergillus niger* ritrovato nella stanza 16

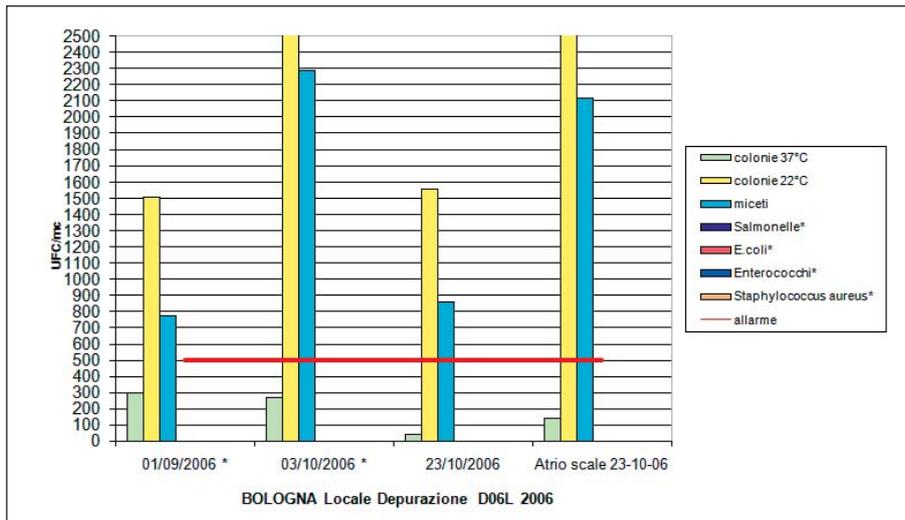


Figura 3. Concentrazione microbica nell'aria dei laboratori di Bologna

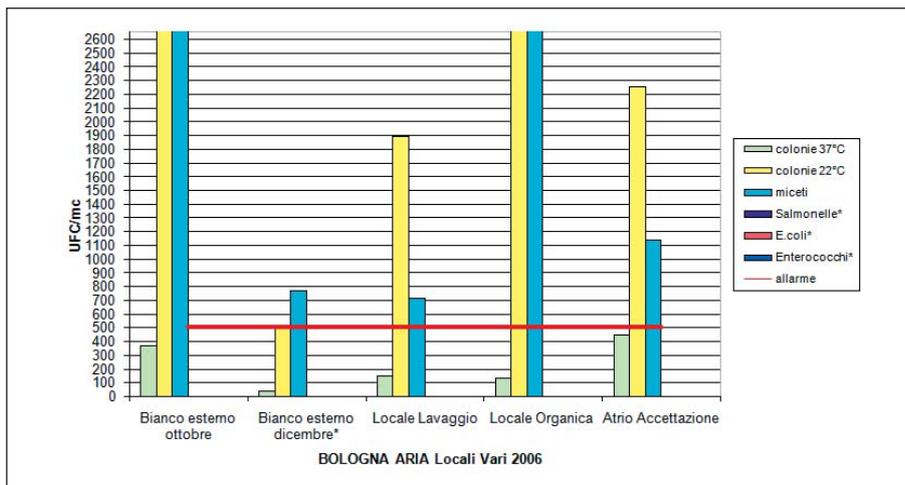


Figura 4. Concentrazione microbica nell'aria dei locali di Bologna

(\*) *Staphylococcus aureus* ricercato in ottobre nei locali lavaggio e Chimica Organica; enterococchi ricercati in ottobre nei locali Lavaggio, Chimica Organica e accettazione; E. coli ricercato solo nel Bianco di Dicembre.

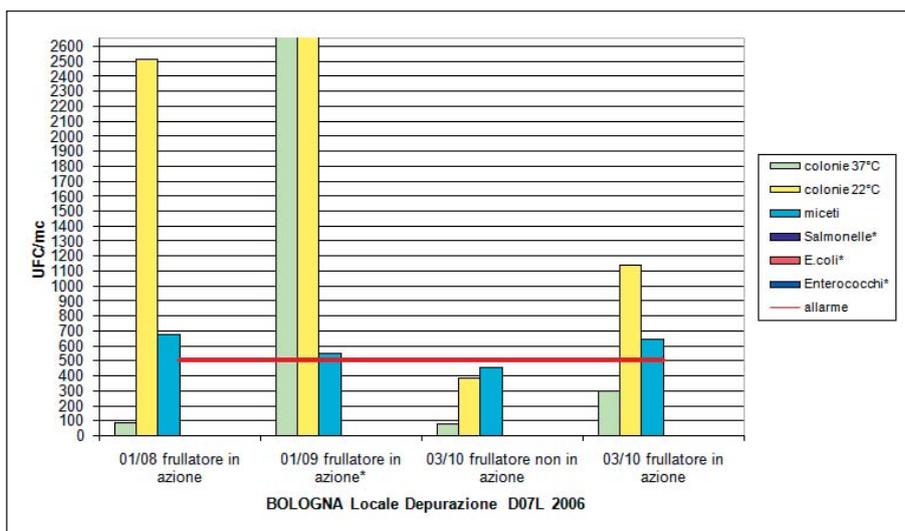


Figura 5. Incidenza dell'operazione di omogeneizzazione di un campione refluo nell'ambiente

(\*) Parametri ricercati solo nel Settembre 2006

di Lavaggio Vetreria (tabella X) e Atrio Accettazione (tabella XI) di Bologna, che effettivamente risentono dell'apporto dell'aria esterna. La contaminazione secondo gli indici IGCM è comunque intermedia. Una contaminazione intermedia si è rilevata anche nei locali Accettazione di Modena e Ravenna; ciò può essere dovuto ad una minore sensibilità del personale alla protezione dei locali ed alla pulizia quotidiana, visto il tipo di matrici che transitano in tali locali.

Si evidenziano elevate concentrazioni di miceti anche nel locale Lavaggio (Stanza 4) del laboratorio di Ferrara, probabilmente dovute all'abitudine di mantenere aperte le finestre.

Per quanto riguarda il presidio laboratoristico di Imola non ci sono particolari segnalazioni da effettuare, tranne la presenza di *Aspergillus niger* nel Locale Accettazione, che, d'altra parte, è il più esposto all'apporto di contaminanti esterni.

#### Altri locali

Una situazione da segnalare, viste le concentrazioni elevate di tutti e tre i parametri di base, si è osservata nello spogliatoio di Ravenna, locale di piccole dimensioni, frequentato da tutto il personale e senza la possibilità di separazione dell'abbigliamento da lavoro da quello pulito. A causa della cattiva climatizzazione, inoltre, le finestre vengono tenute abitualmente aperte. Dalla tabella XII si evince comunque come il livello della contaminazione da cariche batteriche e micetiche sia intermedio.

#### B - Qualità delle Superfici

Le operazioni di sanificazione delle superfici risultano efficaci ovunque; la qualità microbiologica delle superfici dopo sanificazione è infatti accettabile se confrontata con quanto indicato nel "Campionamento e standard di riferimento nell'ambito della verifica del pia-

Tabella X. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali di lavaggio vetreria e/o sterilizzazione

LOCALI LAVAGGIO	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
BOLOGNA	ott-06	142	1889	711	2742	0,07517205	intermedia
RAVENNA	ott-06	180	59	350	589	3,05084746	bassa
FERRARA	ott-06	150	467	1266	1883	0,32119914	intermedia
IMOLA	ott-06	100	135	50	285	0,74074074	molto bassa

Tabella XI. Carica microbica e indici di contaminazione microbica nei locali deputati al ricevimento e smistamento campioni

LOCALI ACCETTAZIONE	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
BOLOGNA	ott-06	444	2250	1133	3827	0,19733333	intermedia
RIMINI	dic-06	172	278	166	616	0,61870504	bassa
IMOLA	ott-06	40	160	90	290	0,25	molto bassa
RAVENNA	ott-06	120	730	900	1750	0,16438356	intermedia
MODENA	ott-06	297	61	1267	1625	4,86885246	intermedia

Tabella XII. Carica microbica e indici di contaminazione microbica in uffici e spogliatoi

LOCALI VARI	DATA	Carica mesofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica psicrofila (UFC/m <sup>3</sup> )	Carica fungina (UFC/m <sup>3</sup> )	IGCM	ICM	CATEGORIA
SEGRETERIA RAVENNA	ott-06	200	550	560	1310	0,36363636	intermedia
SPOGLIATOI RAVENNA	ott-06	1000	2100	900	4000	0,47619048	intermedia

no di autocontrollo aziendale (D.Lgs.155/1997) - Dipartimento di Sanità Pubblica - U. O. Igiene Alimenti e Nutrizione - Azienda USL Città di Bologna" (15). Tale documento è stato preso come riferimento dai laboratori HERA per garantire una esecuzione delle analisi esente da contaminazioni.

Tuttavia esistono punti (come ad esempio le superfici dei locali Accettazione) in cui la concentrazione rilevata prima della disinfezione dimostra come sia facile creare fonti di contaminazione (figure 6, 7 e 8). Come per l'aria anche per il monitoraggio delle superfici si evidenzia l'importanza della formazione, in quanto l'unico modo per riportare la situazione negli standard accettabili è affidato al personale: è necessario prestare particolare attenzione alla pulizia delle superfici che vengono a contatto con flaconi contenenti matrici contaminate.

### Strategie di prevenzione e protezione

Le principali vie di contaminazione del personale in un laboratorio analisi sono:

- Inalazione di bioaerosol generati dall'apertura di contenitori in cui è presente materiale infetto, da centrifugazione, da pipettaggio, ecc.)
- Contatto diretto con cute e/o mucose (schizzi, mani o banchi di lavoro contaminati, ecc.)
- Ingestione accidentale (trasporto di microrganismi alla bocca tramite mani contaminate, contatto con schizzi infetti, ecc.)

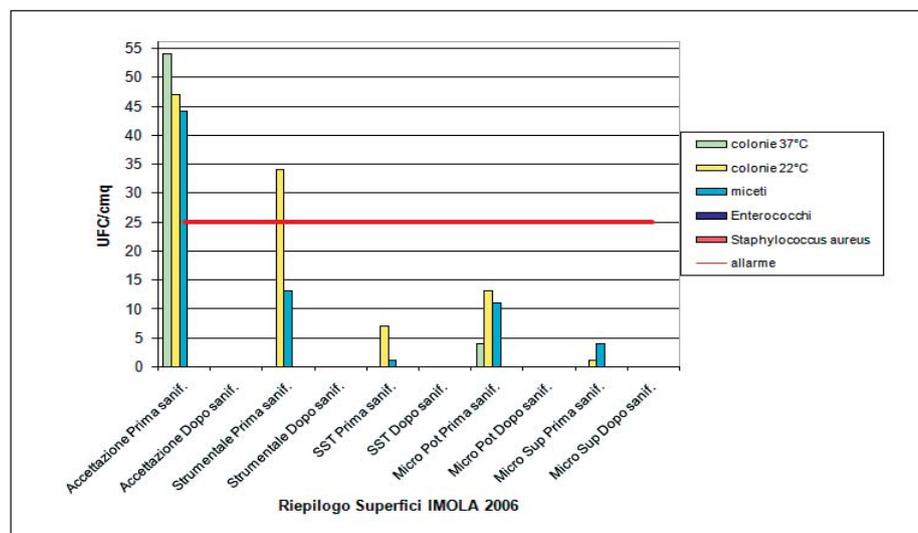
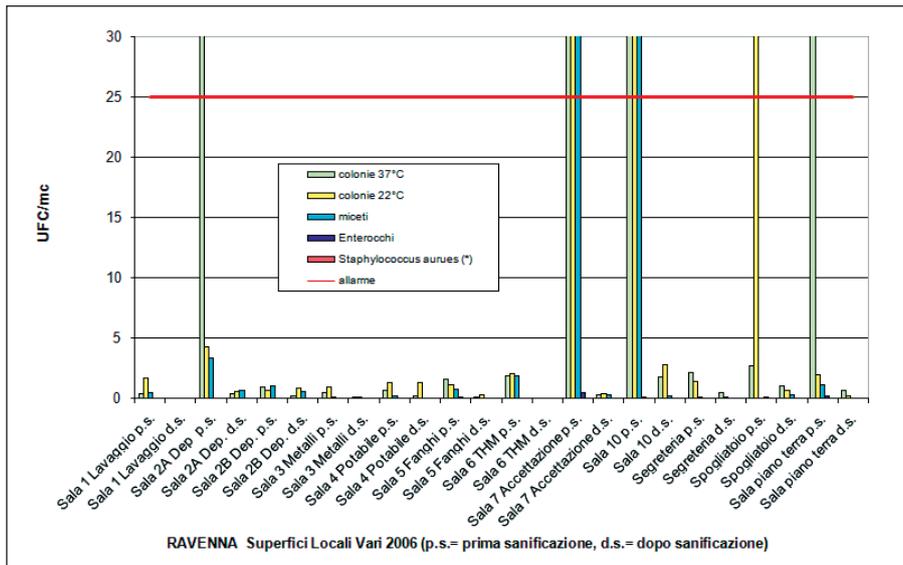
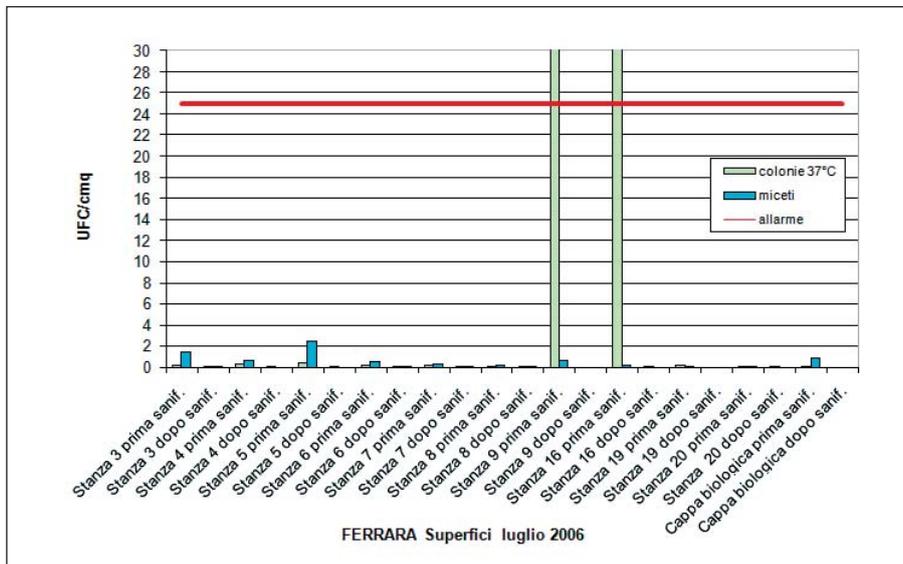


Figura 6. Concentrazione microbica delle superfici nei laboratori di Imola



**Figura 7. Concentrazione microbica delle superfici nei laboratori di Ravenna**  
 (\*) La lettura degli Stafilococchi nelle sale 7, 10 e Piano Terra non è stata possibile per la presenza di flora contaminante



**Figura 8. Concentrazione microbica delle superfici nei laboratori di Ferrara**

- via ematica (contatto con oggetti taglienti infetti, ecc.)
- È noto che per l'insorgere della malattia, però, non basta il contatto con l'agente biologico, ma:
- il microorganismo deve essere patogeno e virulento
  - deve essere assunto in una dose minima infettante
  - l'individuo deve essere ricettivo all'azione del patogeno.

Per gli agenti biologici è difficile determinare limiti di esposizione da utilizzare come valori soglia, in quanto i fattori che intervengono nell'eventuale sviluppo di una patologia non sono facilmente prevedibili. Il superamento dei limiti consigliati e proposti non implica necessariamente l'instaurarsi di condizioni di pericolo, ma il rinvenimento di microrganismi patogeni, per i quali non esistono tabelle di riferimento, costituisce un elemento di rischio indipendentemente dalle concentrazioni osservate.

I risultati di questo lavoro confermano sicuramente l'efficacia di un monitoraggio periodico dell'aria e delle superfici per individuare eventuali fonti di contaminazioni e, quindi, porre rimedio a situazioni critiche, sia per la protezione del personale che per garantire un ambiente adatto alla esecuzione delle analisi.

Tenendo presente quanto sopra esposto e considerato che è difficile eliminare totalmente il rischio espositivo in quanto intrinseco alla tipologia del materiale trattato, l'approccio preventivo è sicuramente determinante.

Si ritiene importantissimo utilizzare le tecnologie che tendono a ridurre il rischio collettivo di esposizione ad agenti biologici così come esposto nell'allegato XII del D.Lgs 626 sulle misure di contenimento (ad esempio cappe a flusso laminare verticale, numero sufficiente di ricambi d'aria, pressione negativa negli ambienti di lavoro, controllo sugli accessi, segregazione degli ambienti di lavoro).

Essendo le vie di introduzione degli agenti biologici nell'organismo umano la via mucocutanea, la via respiratoria, la via ematica e la via orale, si raccomanda l'utilizzo di DPI idonei a creare una efficace barriera (guanti, maschere facciali, occhiali, tute protettive usa e getta, copriscarpe).

Occorre prevedere un'adeguata frequenza delle pulizie ordinarie delle superfici e degli ambienti di lavoro, sensibilizzare la cura dell'igiene personale, la separazione degli indumenti di lavoro da quelli puliti nonché predisporre una idonea profilassi vaccinale.

Fondamentale è inoltre la formazione periodica sulle buone prassi di laboratorio del personale sia propriamente tecnico che ausiliare, affinché acquisisca la consapevolezza del rischio infettivo delle matrici trattate così da rendere più naturale l'utilizzo dei DPI.

### Ringraziamenti

Si ringraziano Francesca Galli, Manuela Corbelli, Claudia Costi della Divisione Reti Ricerca & Sviluppo, Hera SpA, per la collaborazione offerta nella fase operativa e la dott.ssa Liliana Frusteri dell'INAIL per la disponibilità e competenza.

---

**Bibliografia**

- 1) Decreto Legislativo 19 settembre 1994, n. 626: Attuazione delle direttive 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/655/CEE, 89/656/CEE, 90/269/CEE, 90/270/CEE, 90/394/CEE e 90/679/CEE riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro.
- 2) Frusteri L. Rischio biologico negli ambienti di lavoro: dall'accertamento alla prevenzione. Corso di aggiornamento Rischio biologico e tutela della sicurezza e della salute dei lavoratori. Rovigo, 26 maggio 2007.
- 3) UNI 10674:2002 - Acque destinate al consumo umano - Guida generale per determinazioni microbiologiche.
- 4) Benvenuti F, Lombardi R, Pastoni F. Il rischio biologico: procedura applicativa per la valutazione del rischio e la pianificazione degli interventi di prevenzione e protezione. *Ann Ig* 2000; 12 (Suppl. 2): 329-360.
- 5) Istituto Superiore di Sanità -Rapporti ISTISAN 07/5 - Linee guida per le buone pratiche di laboratorio. *Analisi microbiologica delle acque*, 2007: 9-16.
- 6) ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 7) Manuale di sicurezza nei laboratori. Terza Edizione. ISPESL-AIRE-SPSA Suppl. di Prevenzione Oggi Numero 2, 2005.
- 8) INAIL - Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi. Consulenza tecnica - Accertamento rischi e prevenzione. Edizioni 2005.
- 9) Ligugnana R. Il monitoraggio microbiologico ambientale nelle camere operatorie ed ambienti a rischio infettivo. *Note applicative* 1998; n. 86: 1-4.
- 10) Magnapera C, Carbone G. Monitoraggio del Bioaerosol in un impianto di riciclaggio di rifiuti solidi urbani. *Biologi italiani* 2006; 4: 37-46.
- 11) Dacarro C, Grignani E, Lodola L, Grisoli P, Cottica D. Proposta di indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria degli edifici. *G It Med Lav Erg* 2000; 22 (3): 229-235.
- 12) UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
- 13) Vonesh N, Tomao P, Di Renzi S, Vita S, Signorini S. La biosicurezza nei laboratori per gli esposti ad agenti biologici. *G Ital Med Lav Erg* 2006; 28(4): 444-456.
- 14) Emondi V, Pasinetti E. Valutazione della contaminazione microbica dell'aria in un impianto di depurazione biologica delle acque reflue. *Biologi Italiani* 2004; 11: 49-54.
- 15) Dipartimento di Sanità Pubblica - U. O. Igiene Alimenti e Nutrizione - Azienda USL Città di Bologna - "Campionamento e standard di riferimento nell'ambito della verifica del piano di autocontrollo aziendale (D.Lgs. 155/1997), 2001.
- 16) Grisoli P, Rodolfi M, Grignani E, Cottica D, Picco A. M, Dacarro C. Utilizzazione di indici microbiologici per la valutazione della salubrità dell'aria negli ambienti di lavoro. *L'Igiene Moderna* 2003; 119: 283-298.
- 17) Giovinnazzo R, Venanzetti F, Frusteri L, Guerrera E, Sarto D, Anzidei P. Il monitoraggio microbiologico degli ambienti di lavoro. proposta CONTARP di linee guida per il campionamento e l'analisi. *Convenzione Ambiente Lavoro "Il rischio biologico negli ambienti di lavoro: aspetti generali ed applicativi"* Bologna 7 giugno 2007 .

**Richiesta estratti:** *Elisa Cavallari, Laboratorio Unità Bologna, via Setta, 4, 40037 Sasso Marconi (BO), Italy - E-mail: [elisa.cavallari@gruppohera.it](mailto:elisa.cavallari@gruppohera.it)*