



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# AGENTI NON CLASSICI ASSOCIATI A TSE

*Aggiornamento in materia di Salute Biosicurezza Sicurezza*

*Paola Marconi  
2017*

*Firenze 20,27 settembre, 18 ottobre*





# *Ministero della Salute*

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI  
*Ufficio 3 - Centro Nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali -  
Unità centrale di crisi*

Registro – Classif. I.I.a.e./2017/26

Allegato:1

**Agli II.ZZ.SS.**

**e p.c. All'UFF 2 DGSAFV**

**AI CEA – IZS Torino**  
[izsto@legalmail.it](mailto:izsto@legalmail.it)

**All'ISS Roma**  
[protocollo.centrale@pec.iss.it](mailto:protocollo.centrale@pec.iss.it)

**Oggetto:** Diagnosi TSE: Principi di biosicurezza applicabili ai laboratori Test Rapidi inseriti nel programma di sorveglianza epidemiologica delle encefalopatie spongiformi trasmissibili.

## **Linee Guida.**

Nasce l'esigenza di dover assicurare, per ogni esame diagnostico, oltre all'accuratezza della prova e del risultato e all'uniformità della singola indagine anche la protezione degli operatori di laboratorio e dell'ambiente. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha da tempo riconosciuto come la *biosicurezza* abbia un'importanza fondamentale nell'ambito dei processi organizzativi e decisionali delle strutture coinvolte tale da spingere a sviluppare compendi riguardanti nozioni pratiche per la manipolazione in sicurezza dei microrganismi patogeni e potenzialmente tali nei laboratori.

Trasmissione elettronica  
N. prot. DGSAF in  
Docspa/PEC

# Decreto 81/2008

## ALLEGATO XLVI ELENCO DEGLI AGENTI BIOLOGICI CLASSIFICATI

Agenti non classici associati con le encefaliti (encefalopatie) spongiformi trasmissibili (TSE) (i):

|  |       |     |     |
|--|-------|-----|-----|
| • Morbo di Creutzfeldt-Jakob                 | 3(**) | D   | (d) |
| • Variante del morbo di Creutzfeldt-Jakob    | 3(**) | D   | (d) |
| • BSE ed altre TSE degli animali             | 3(**) | D   | (d) |
| • Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker | 3(**) | D   | (d) |
| • Kuru 3(**)                                 | D     | (d) |     |

D l'elenco dei lavoratori che hanno operato con detti agenti dove essere conservato per almeno dieci anni dalla cessazione dell'ultima attività comportante rischio di esposizione;

(d) Raccomandato per i lavori che comportano un contatto diretto con questi agenti.

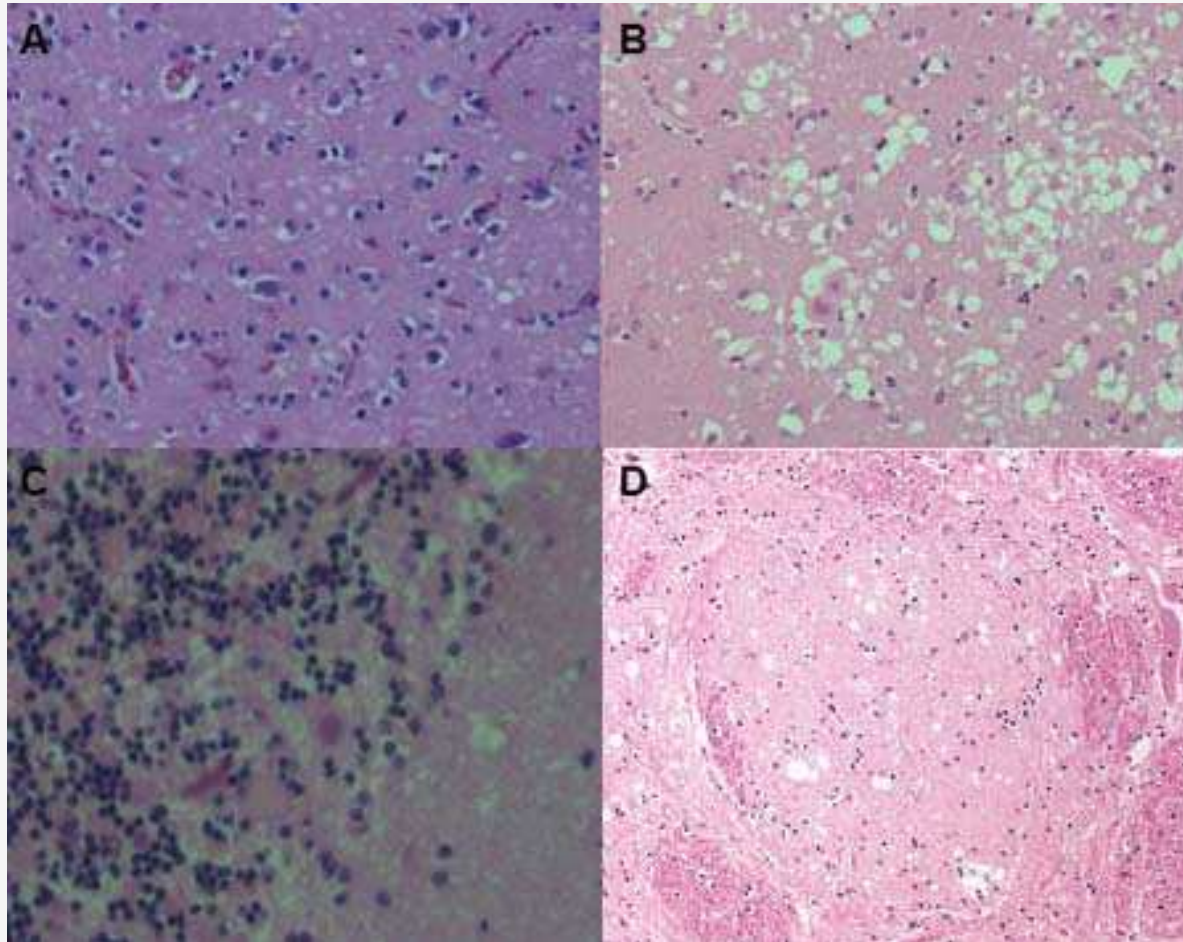
6. Taluni agenti classificati nel gruppo 3 ed indicati con doppio asterisco (\*\*) nell'elenco allegato possono comportare un rischio di infezione limitato perché normalmente non sono veicolati dall'aria.

Nel caso di particolari attività comportanti l'utilizzazione dei suddetti agenti, in relazione al tipo di operazione effettuata e dei quantitativi impiegati può risultare sufficiente, per attuare le misure di cui ai punti 2 e 13 dell'ALLEGATO XLVII ed ai punti 2, 3, 5 dell'ALLEGATO XLVIII, assicurare i livelli di contenimento ivi previsti per gli agenti del gruppo 2.



- **CORRELAZIONE**
- **BSE / malattia di Creutzfeldt Jacob variante nell'uomo**

A sporadic CJD



B) NEW VARIANT CJD



D) BSE

C Kuru

Histopathology shows spongiform changes in brain  
(pictures A-C Hans Kretzschmar, München, D Martin Groschup, Insel Riems)

ARTICLE

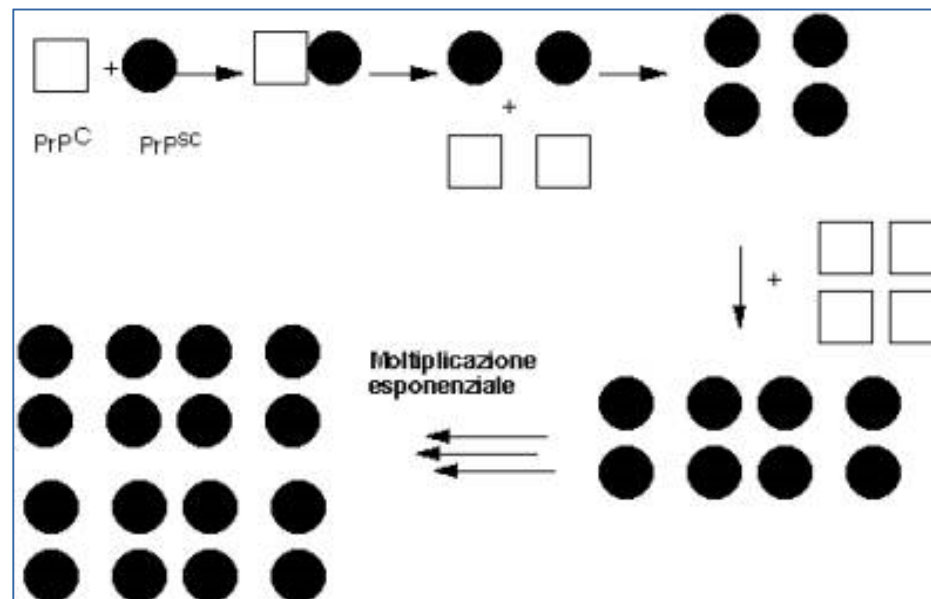
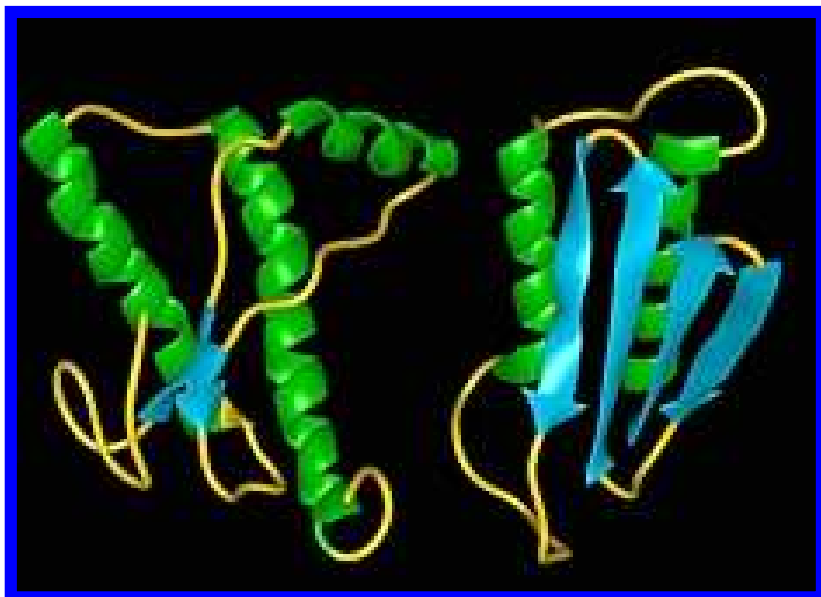
Received 7 Aug 2014 | Accepted 10 Nov 2014 | Published 16 Dec 2014

DOI: 10.1038/ncomms6821

# Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions

**Tabella 1.** Malattie prioniche dell'uomo e degli animali e loro probabile eziologia.

| Specie ospite   | Malattia  | Probabile eziologia  |
|-----------------|---|--|
| Uomo            | Malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica                                   | Sconosciuta (spontanea?)   |
|                 | Insomnia fatale sporadica (rarissima)                                     |  |
|                 | Prionopatia con sensibilità variabile alle proteasi                       | Procedure medico chirurgiche   |
|                 | Malattia di Creutzfeldt-Jakob iatrogena                                   | Agente della BSE attraverso il consumo di alimenti infetti                           |
|                 | Malattia di Creutzfeldt-Jakob variante                                    | Trasfusione di sangue infetto.<br>Terapia con plasma-derivati (?)                    |
| Ovino e caprino | Malattia di Creutzfeldt-Jakob variante iatrogena                          | Genetica (mutazione del gene <i>PRNP</i> )   |
|                 | Malattia di Creutzfeldt-Jakob genetica                                    | Infettiva (agente della scrapie)   |
|                 | Sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker                                |  |
|                 | Insomnia fatale familiare   |  |
| Bovino          | PrP-Angiopatia amiloidotica cerebrale                                     | Sconosciuta (spontanea?)   |
|                 | Scrapie   | Infettiva (agente della BSE)   |
|                 | Scrapie atipica   | Infettiva (agente della BSE per via alimentare)                                      |
|                 | BSE   | Sconosciuta (spontanea?)   |
| Visone          | Encefalopatia spongiforme trasmissibile (C-type BSE)                      | Infettiva (per via alimentare con agente infettivo di incerta origine)               |
|                 | H-type and L (or BASE)-type BSE   | Infettiva (agente della CWD per via alimentare, contagio, contaminazione ambientale) |
| Cervidi         | Encefalopatia trasmissibile del visone (TME)                              | Infettiva (agente della BSE?)  |
| Felidi          | Chronic wasting disease (Malattia da deperimento cronico del cervo - CWD) |  |
|                 | Encefalopatia spongiforme felina  |  |



**Carattere zoonosico non del tutto definito per tutti gli agenti TSE**

**Lunga incubazione**

**Resistenza ai trattamenti convenzionali**

**Assenza metodi di rilevazione ambientale**

**Bassa dose infettante**

**Assenza di trattamenti terapeutici o profilattici**



**Tabella 2** - Misure e livelli di contenimento\*\*§

| Misure di contenimento  |  | Livello di contenimento           |  |
|---|--|-----------------------------------|--|
|   |  | 2                                 | 3  |
| 1. La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio   |  | No                                | Raccomandato                                 |
| 2. L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile |  | No                                | Si, sull'aria estratta                       |
| 3. L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate  |  | Raccomandato                      | Si   |
| 4. La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione   |  | No                                | Raccomandato                                 |
| 5. Specifiche procedure di disinfezione   |  | Si                                | Si   |
| 6. La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica                                  |  | No                                | Raccomandato                                 |
| 7. Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti  |  | Raccomandato                      | Si   |
| 8. Superfici idrorepellenti e di facile pulitura  |  | Si per il banco di lavoro, arredo | Si, per il banco di lavoro e pavimento       |
| 9. Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti  |  | Raccomandato                      | Si   |
| 10. Deposito sicuro per agenti biologici  |  | Si                                | Si   |
| 11. Finestra d'ispezione o altro dispositivo  |  | Raccomandato                      | Raccomandato                                 |
| 12. I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria  |  | Raccomandato                      | Raccomandato                                 |
| 13. I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cappe di sicurezza, isolati o altri adeguati contenitori |  | Ove opportuno                     | Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria |
| 14. Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse degli animali  |  | Raccomandato                      | Si (disponibile)                             |
| 15. Mezzi e procedure per il trattamento  |  | Si                                | Si   |
| 16. Trattamento delle acque reflue  |  | No                                | Facoltativo                                  |

\* ALLEGATO XLVII, Decreto Lgs 81/2008 - Specifiche sulle misure di contenimento.

§ per gli agenti appartenenti alla classe 3\*\*, sulla base dell'analisi del rischio, per le misure di cui ai punti 2 e 13 (in corsivo) può essere sufficiente assicurare livelli di contenimento previsti per gli agenti del gruppo 2.





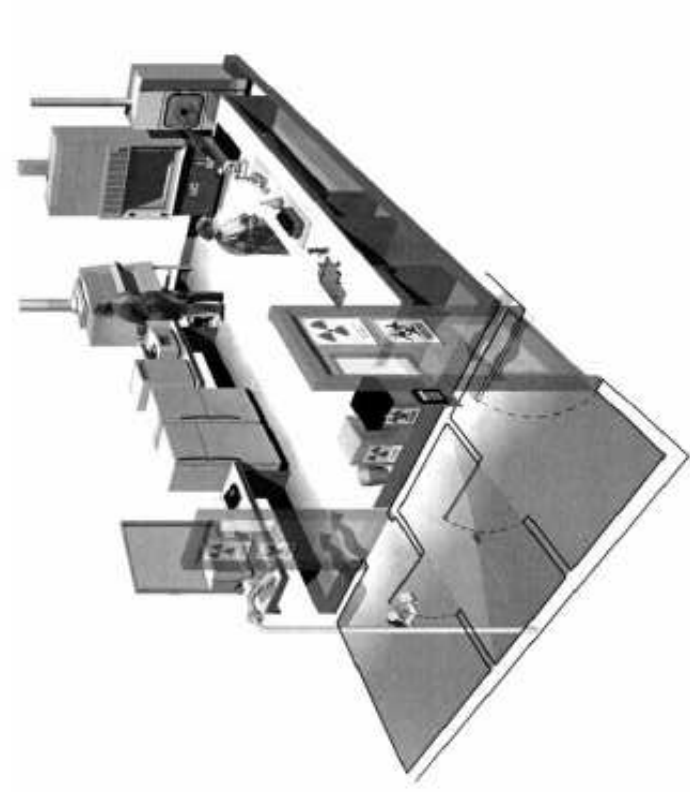
## Misure di contenimento

## Livello di contenimento

|   | 2                         | 3  |
|---|---------------------------|--|
|   |                           |  |
| 1. La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio   | No                        | Raccomandato                                 |
| 2. L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile   | No                        | Si, sull'aria estratta                       |
| 3. L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate  | Raccomandato              | Si   |
| 4. La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione   | No                        | Raccomandato                                 |
| 5. Specifiche procedure di disinfezione   | Si                        | Si   |
| 6. La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica                                    | No                        | Raccomandato                                 |
| 7. Controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti  | Raccomandato              | Si   |
| 8. Superfici idrorepellenti e di facile pulitura  | Si per il banco di lavoro | Si, per il banco di lavoro e pavimento       |
| 9. Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti  | Raccomandato              | Si   |
| 10. Deposito sicuro per agenti biologici  | Si                        | Si   |
| 11. Finestra d'ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti  | Raccomandato              | Raccomandato                                 |
| 12. I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria  | No                        | Raccomandato                                 |
| 13. I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cappe di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori | Ove opportuno             | Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria |
| 14. Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse degli animali  | Raccomandato              | Si (disponibile)                             |
| 15. Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti  | Si                        | Si   |
| 16. Trattamento delle acque reflue  | No                        | Facoltativo                                  |



Livello di contenimento 2



Livello di contenimento 3

## Principali differenze tra laboratori di contenimento 2 e 3:

- nelle norme di comportamento
- nella progettazione
- sorveglianza sanitaria.

### **Norme di comportamento:**

- I DPI prevedono calzari, camice monouso con maniche lunghe, cuffie e mascherine.
- La manipolazione di materiale potenzialmente infetto va effettuato sotto cappa biologica adeguata.

### **Progettazione:**

- Deve essere presente un'anticamera o zona filtro dove indossare i DPI.
- Il laboratorio deve essere separato dalle aree aperte al flusso di persone non autorizzate
- Le porte devono essere a chiusura automatica e interbloccate
- La stanza deve essere sigillabile
- Deve esserci un impianto di aereazione che consenta di mantenere una pressione negativa all'interno del laboratorio.
- Filtri HEPA sull'aria estratta. E' possibile usare filtri anche per far ricircolare l'aria all'interno del laboratorio. Devono poter essere decontaminati e testati
- Dovrebbe essere disponibile un'autoclave

# Laboratori e stabulari

Controllo dell'accesso





- **Prelievo alla sala necroscopica**
- Effettuato da personale autorizzato e abilitato, che si attiene alle procedure di sicurezza
- Nell'anticamera vengono indossati gli idonei DPI: calzari monouso o stivali di gomma/ camice monouso idrorepellente. All'interno sono a disposizione visiere da indossare per le manualità che possono comportare schizzi di materiale biologico o frammenti di tessuto o ossei
- Il campione correttamente identificato viene trasportato in laboratorio in contenitori adeguati a chiusura ermetica e infrangibili.



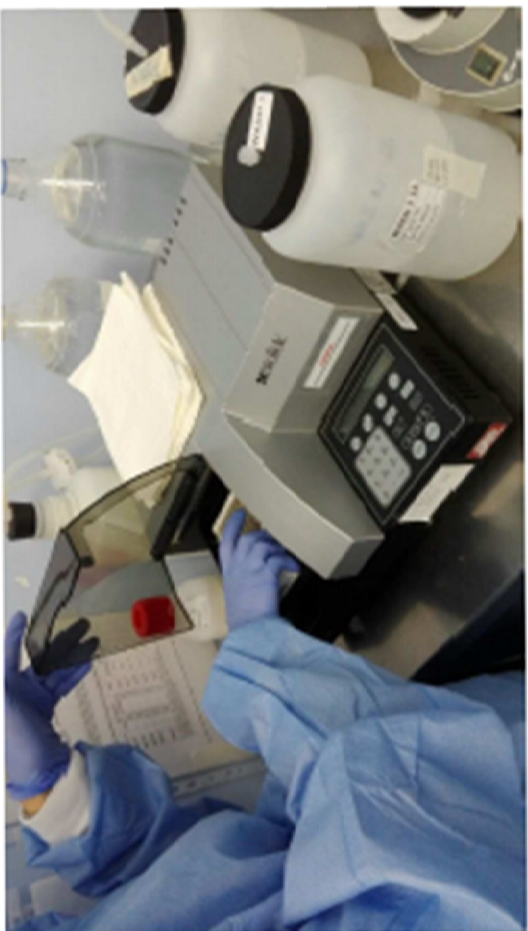
# 2

- **Apertura e taglio campioni** (attenzione ad aprire pacchi non a norma)
  - Sotto cappa classe II
- I campioni vanno manipolati in sicurezza , pertanto l'apertura deve essere fatta sotto cappa a flusso laminare, indossando idonei DPI.
- Valutare la necessità di bonificare la parte esterna del contenitore (fuoriuscita di sangue/materiale biologico)
- I campioni vanno sempre movimentati, all'interno dell'ambiente di lavoro, in condizioni di sicurezza utilizzando idonei contenitori per evitare perdite e versamenti accidentali.
- **Contenere la dispersione di aerosol** (omogenizzatori, etc)



# 3

- **Esecuzione del test**
- Sotto cappa classe II fino alla dispensazione del substrato ( da questa fase in poi è possibile lavorare fuori cappa o senza flusso laminare).
- Tutte le fasi del test vanno effettuate con DPI appropriati.





# 4

- **Trasporto e stoccaggio all'interno della struttura**
  - Trasporto
    - Utilizzare contenitori secondari adeguati (a tenuta, con materiale assorbente, e infrangibile)
  - Stoccaggio
    - Utilizzare contenitori adeguati (a tenuta e con adeguata resistenza agli insulti fisici o chimici)
    - Armadi e freezer ad accesso controllato
  - Tracciabilità
    - E' necessario avere registri di carico/scarico e giacenza aggiornati

## • Trasporto all'esterno del laboratorio

- Il contenitore primario deve essere a chiusura ermetica e dotato di etichetta autoadesiva indelebile. E' preferibile l'uso di materiale infrangibile (es. provette in plastica con tappo ermetico). Tra il contenitore primario e secondario è buona norma mettere del materiale assorbente, che possa contenere eventuali versamenti di materiale biologico o rotture.
- Il contenitore secondario deve essere a tenuta stagna, serve a proteggere il contenitore primario e al suo interno può ospitarne più di uno. Anch'esso deve essere correttamente identificato tramite apposita etichetta.
- In caso di provette o eppendorf utilizzare appositi supporti, all'interno di contenitori chiusi, che consentano il mantenimento della posizione eretta in modo da ridurre il rischio di fuoriuscita del materiale biologico.
- Il contenitore esterno protegge quello secondario da danneggiamenti fisici durante il trasporto. Anch'esso deve recare le informazioni necessarie ad identificare il materiale all'interno.



# 5 Bonifica e disinfezione

- **Superfici e ambienti**
  - Idrossido di sodio 2N (40g NaOH/litro acqua) per  $\geq 1$  ora o
  - Sodio ipoclorito 2% (20.000 ppm) di cloro attivo per  $\geq 1$  ora
    - E' opportuno disporre di misuratore di cloro attivo
  - Perossido di idrogeno (eventuale supplemento per la sanitizzazione dell'ambiente)
- **Strumenti**
  - Idrossido di sodio 1N per  $\geq 1$  ora, neutralizzare, e autoclavare°
  - Sodio ipoclorito 2% (20.000 ppm) di cloro attivo per  $\geq 1$  ora, rimuovere, autoclavare
  - Sciacquare e autoclavare
- **Materiale di scarto**
  - Liquido
    - Decontaminare con idrossido di sodio per arrivare ad una concentrazione finale 2N
    - Neutralizzare
    - Autoclavare
  - Solidi
    - Autoclavare 134° C, 2 cicli da 1 ora in autoclave a vuoto con ricircolo

- **Bonifica in caso di incidente (contaminazione con materiale potenzialmente TSE positivo)**
  1. Indossare i DPI, delimitare l'area interessata e assorbire il materiale versato con carta, segatura ecc..
  2. Bonificare con ipoclorito di sodio 20000ppm o NaOH 2M e lasciare agire per almeno un'ora.
  3. Risciacquare abbondantemente con acqua

- **Bonifica e disinfezione strutture BSL2 e 3**

| Pulizia e disinfezione  |
|---|
| Istruzioni per il corretto utilizzo dei disinfettanti devono essere a disposizione del personale.   |
| Qualora le operazioni di pulizia e disinfezione siano affidate a ditta esterna: prevedere e formalizzare una formazione dettagliata con istruzioni operative specifiche e periodo di tutoraggio inerente le modalità di attuazione delle operazioni, concentrazioni dei prodotti da utilizzare, gestione dei materiali dedicati alle attività |



# 6

- **Smaltimento rifiuti**

1. Liquidi di scarto della prova trattati con ipoclorito di sodio con concentrazione finale 2M in appositi bidoni e portati in un deposito transitorio lontano dai laboratori.
2. I rifiuti solidi vengono raccolti in appositi contenitori e mandati all'incenerimento
3. La gestione dello smaltimento è affidata ad una ditta specializzata

# Gestione incidenti, emergenze e formazione

- **Gestione delle emergenze**
  - Avere a disposizione immediata i contatti delle persone da contattare
  - Distacco di corrente in BSL3 (gruppi elettrogeni)
  - Etc.
- **Formazione (obbligatoria)**
  - Tutte le persone prima di essere autorizzate a frequentare i laboratori devono ricevere una adeguata e formale formazione e addestramento generale e specifica (prioni) relative alle procedure e agli eventuali rischi di laboratorio.
  - La formazione deve prevedere corsi di aggiornamento periodici obbligatori (almeno ogni 5 anni).
  - Tenere i registri della formazione e addestramento delle singole persone

## Dispositivi di protezione individuale (DPI)

- I DPI sono classificati in tre categorie, per rischio crescente.
- Tutti i DPI devono essere conformi e avere la marcatura CE, devono essere a disposizione del personale in quantità adeguata e devono essere adeguatamente conservati (data scadenza...)
- La scelta dei DPI deve essere fatta sulla base della **valutazione del rischio** e dell'attività svolta.
- **Entrata in strutture BSL2**
  - Usare scarpe dedicate. Doppie calzature
  - Camice categoria II
  - Camice monouso (azzurro): idrorepellente e traspirante con manicotti
  - Nel bisogno maschere filtranti
  - Non utilizzare al di fuori del laboratorio e tenere separati dagli abiti civili





## Dispositivi di protezione individuale (DPI)

- **Entrata e attività in sala necroscopica**
  - Doppi calzari o pianelette e calzari
  - Camice monouso idrorepellente
  - Doppi guanti e guanti anti taglio
  - Se necessario visiera in plastica, occhiali protettivi





*Ministero della Salute*

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI  
*Ufficio 3 - Centro Nazionale di lotta ed emergenza contro le malattie animali -  
Unità centrale di crisi*

0016416-12/07/2017-DGSAF-MDS-P



Principi di biosicurezza applicabili ai laboratori Test Rapidi inseriti nel programma di sorveglianza epidemiologica delle encefalopatie spongiformi trasmissibili

PRIONI

La sicurezza

Daniela Meloni

Portici 21 dicembre 2016

Decreto Legislativo 81/2008