

EVALUAREA RISCULUI MICROBIOLOGIC. MĂSURI DE PROTECȚIE ÎN LABORATOR.

Dr. Maria Nica*, Dr. Iuliana Apostol**

*Spitalul Clinic Boli Infecțioase și Tropicale Dr. Victor Babeș

**Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș” – București

REZUMAT

Laboratorul de microbiologie este considerat prima linie de detectare a evenimentelor neobișnuite, de natura infecțioasă. Circulația datelor către autoritățile naționale și internaționale este realizată prin utilizarea strategiilor de supraveghere pasivă și activă. OMS a clasificat microorganismele în 4 grupe de risc infecțios. De asemenea, OMS a clasificat laboratoarele de microbiologie în 4 niveluri, în funcție de gradul de protecție necesar pentru personal, mediul înconjurător și comunitate: nivele I și II – laboratoare de bază, nivel III – nivel restrictiv, nivel IV – laborator de maximă restricție. Limitarea bioriscului constă în asigurarea barierelor antiinfecțioase, primare și secundare. Regulile de siguranță microbiologică și antiepidemică impun ca laboratoarele de microbiologie să funcționeze în circuit cu sens unic. Echipamentul individual de protecție este obligatoriu pentru personal, iar activitatea trebuie să se desfășoare în boxe de siguranță antiepidemică. Dotarea tehnică obligatorie a laboratoarelor de microbiologie include aparatura de sterilizare, iar controlul eficienței sterilizării trebuie efectuat periodic prin teste chimice și biologice.

Cuvinte cheie: bioterrorism, biorisc, grupe de risc, biosiguranță, biosecuritate

ABSTRACT

The microbiology laboratory is considered to be the first line for detection of unusual biological events. The national and international authorities receive the informational flux through the use of passive or active surveillance strategies. WHO has classified microorganisms in 4 infectious risk groups. WHO has also classified microbiology laboratories in 4 levels, based on protection level necessary for personnel, environment and community: BSL I/II-basic laboratories; BSL III- restrictive level and BSL IV-maxim restrictive level. Biorisk reduction consists in primary and secondary antiinfectious barriers. Biorisk hazard necessitates one way circuit inside the microbiology laboratories. Specific biosafety rules are wearing special equipment by the laboratory personnel and running specific activities inside biosafety cabinets. Each microbiology laboratory is mandatory to be equipped with sterilising devices and the control of sterilizing efficiency must be done periodically through chemical and biological tests.

Key words: bioterrorism, biological risk, risk groups, biological safety, biosecurity

Noile amenințări microbiologice, ca de exemplu sindromul respirator acut sever și actualele forme de gripă umană cât și posibilitatea bioterrorismului evidențiază nevoia implementării unor programe de supraveghere a bolilor infecțioase. Crearea de rețele de supraveghere pentru combaterea bioterrorismului începe cu includerea *laboratoarelor de microbiologie*, care constituie verigi sau noduri cheie ale rețelei. Laboratoarele de microbiologie facilitează stabilirea unui diagnostic etiologic de suspiciune sau certitudine, putând fi prima linie de detectare a evenimentelor neobișnuite de natura infecțioasă. Datorită rolului pivotal în identificarea amenințărilor de natura infecțioasă, aceste laboratoare ar trebui să participe la elaborarea strategiilor de raportare, de transmite

rapidă a informațiilor și de implementare a unor măsuri de intervenție (3).

Tradițional, circulația datelor către autoritățile naționale și internaționale este realizată prin utilizarea strategiilor de supraveghere pasivă. Programele de supraveghere activă, utilizând tehnici și metodologii noi, sunt superioare în detectarea timpurie a caracteristicilor neobișnuite ale patogenilor microbieni și apariției focarelor epidemice. Implementarea unor strategii de răspuns la situații neobișnuite trebuie planificată și realizată în cooperare cu laboratoarele de microbiologie, iar protocoalele de intervenție trebuie definite prin participarea microbiologilor clinici.

Microorganismelor prezintă un risc infecțios, clasificat de OMS-Organizația Mondială a Sănătății în 4 grupe de risc individual și colectiv.

Tabelul 1.

Clasificarea agenților infecțioși în raport cu riscul infecției de laborator (11,12,13)

Grup	Risc	Exemple
I	Individual: redus Colectiv: redus	– Germeni nepatogeni, condiționat patogeni (oportuniști): <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> etc.
II	Individual: moderat Colectiv: redus	– Fungi dermatofiti, oportuniști, – Bacterii: gen <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrionaceae</i> ; specii <i>St. aureus</i> , <i>Str. pneumoniae</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Yersinia spp</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Brucella spp</i> , – Virusuri: virusurile hepatitei B, C; Virusul CMV, HIV, – <i>Rickettsii</i> (tifos exantematic, febre patate), <i>Coxiella burneti</i> .
III	Individual: mare Colectiv: redus	– <i>Rickettsii</i> , <i>Coxiella burneti</i> , <i>Chlamidia psittaci</i> – Numai la manipularea culturilor: <i>Brucella spp</i> , <i>Francisella</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , – Risc de aerosoli: <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Cl. botulinum</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , – Manipularea tulpinilor multirezistente la antibiotice: <i>Yersinia pestis</i> – West Nile virus.
IV	Individual: mare Colectiv: mare	– Virusurile febrei hemoragice: Marburg, Congo-Crimea, Omsk, Lassa, Ebola, Machupo, – Smallpox virus.

Lucrul cu agenți microbiologici cu un înalt risc patogen impune reguli stricte de *control al bioriscului în cadrul laboratoarelor de microbiologie*. Procedurile de **biosiguranță** descriu caile de manipulare și lucrul corespunzător cu patogenii în cadrul laboratorului de microbiologie, în vederea minimizării riscului de expunere și de infecții secundare. Procedurile de **biosecuritate** descriu responsabilitățile și metode de cuantificare a materialelor biologice utilizate în cadrul laboratorului de microbiologie, în vederea protejării lor de pierdere, furt sau folosire rea-voită, intențională.

Laboratoarele de microbiologie sunt clasificate de OMS în 4 niveluri diferite, în funcție de gradul de protecție necesar pentru personal, mediu înconjurător și comunitate. În funcție de exigența siguranței antiinfecțioase există 4 niveluri diferite: nivelurile I și II corespund laboratoarelor de bază, nivelul III laboratoarelor cu regim restrictiv, iar

nivelul IV laboratoarelor cu regim de maximă restricție. Majoritatea agenților biologici umani necesită precauții din categoria II. Dacă pentru identificare se folosesc operații, ca de exemplu: sonicarea, mojararea, centrifugarea, agitarea energetică, operații prin care se formează aerosoli cu potențial infecțios, sunt necesare măsuri de protecție de nivel II-III. Măsurile de siguranță din categoria IV sunt necesare dacă se lucrează cu agenți înalt infecțioși, posibil letali, cu cale de infectare aeriană și pentru care nu sunt disponibile mijloace corespunzătoare de tratament sau vaccine (1).

Un laborator este autorizat să manipuleze microorganisme cu un anumit grad de risc, numai în măsura în care personalul este pregătit profesional și poate fi monitorizată periodic starea de sănătate a acestuia, există dotările necesare și se pot aplica metodele de siguranță pentru prevenirea răspândirii agenților infecțioși.

Tabelul 2.

Clasificarea laboratoarelor în funcție de exigența siguranței antiinfecțioase (8,13)

Grupe de risc	Laboratoare		Exigențe impuse	
	Clasificare	Exemple	Regim de activitate	Echipament de siguranță
I	Nivel 1 – de bază	Învățământ secundar	GLP (good laboratory practice)	Lucru pe masa deschisă
II	Nivel 2 – de bază	Laboratoare clinice/ laboratoare de sănătate publică; Învățământ universitar	GLP, Echipament de protecție, Semnalizarea riscului biologic	Boxa de siguranță clasa I sau II, pentru activități generatoare de aerosoli.
III	Nivel 3 – regim restrictiv	Laboratoare de analize specializate	Nivel 2, Echipament de protecție individuală, Acces controlat	Boxa de siguranță clasa I sau II, pentru toate activitățile.
IV	Nivel 4 – regim de maximă restricție	Laboratoare care lucrează cu germeni înalt patogeni	Nivel 3, Control strict al eliminării aerului contaminat, apelor reziduale, deșeurilor infecțioase	Boxa de siguranță clasa III.

În laboratoarele de microbiologie sunt obligatorii măsuri de prevenție privind limitarea răspândirii germenilor patogeni în laborator, prevenție pentru personal și pentru răspândirea germenilor patogeni în mediu și care reprezintă bariere anti-infecțioase (8,11,12,13). Barierele antiinfectioase se referă la practicile și tehnicile de microbiologie utilizate în manipularea probelor biologice, siguranța echipamentului (bariere primare) și facilitățile laboratorului (bariere secundare).

A. Practicile și tehnicile de microbiologie utilizate

În cadrul laboratoarelor de microbiologie clinică este necesară respectarea practicilor standard referitoare la probele biologice, mediile de cultură și reactivi, recipientele și reziduurile infecțioase și la personalul de laborator. Regulile de siguranță microbiologică și antiepidemică impun ca laboratorul de microbiologie clinică să funcționeze cu circuit în sens unic (separarea în timp și spațiu a circulației probelor biologice, pentru evitarea contaminărilor încrucișate) și să existe acces limitat sau controlat în cadrul laboratorului.

Transportul probelor biologice potențial patologice către compartimentele de diagnostic, se realizează în cutii din material lavabil, cu capac și etichetate (10). Metodele de diagnostic de laborator îmbină tehnicile clasice (cultivarea, imunodiagnosticul-ELISA) cu tehnicile moderne și rapide (de exemplu: tehnici moleculare, amplificare genică – PCR). Prin reacții de amplificare genică, folosind primeri universali, este posibilă identificarea agentului etiologic bacterian, fungic sau viral, în câteva ore (5,6,7). În incinta laboratorului trebuie respectate următoarele: etichetarea recoltarelor cu însemnul riscului biologic pentru produsele provenite de la pacienți infectați HIV, cu virusul hepatitei B, C sau alte microorganisme din categoriile II și III; interzicerea pipetării cu gura (se folosesc dispozitive de pipetare); folosirea anselor și pipetelor de unică utilizare în locul celor din sticlă sau reutilizabile; folosirea tuburilor și a recipientelor din sticlă termorezistentă, cu dopuri sau capișoane din metal, înșurubabile; înlocuirea sticlăriei cu fisuri; descărcarea ansei cu cultura de *Mycobacterii* (aderență la buclă) în flacon cu nisip și alcool 96%, înainte de flambarea ei (evitarea formării de aerosoli).

Materialul infecțios rezultat din procesul de prelucrare bacteriologică precum și din etapele de diagnostic, este recuperat în saci autoclavabili, separând sticlăria de materialul plastic, apoi în găleți de inox cu capac, etichetate corespunzător.

Deșeurile rezultate se autoclavează și se transportă în cutii galbene de carton, etichetate, către un incinerator autorizat. Materialele contaminate înțepătoare – tăietoare (ace de seringă, lame de bisturiu) se încarcă în recipiente de plastic galbene cu capac, etichetate corespunzător și se incinerează.

Dezinfecția este distrugerea formelor vegetative ale microorganismelor, nu și a sporilor. Substanțele dezinfectante sunt agenți chimici cu efect antibacterian nespecific. Substanțele dezinfectante se aplică numai pe suprafețe inerte datorită efectelor iritante sau toxice, iar substanțele antiseptice, având toxicitatea mai redusă pot fi aplicate pe tegument, mucoase sau plăgi. Cele mai sensibile la acțiunea substanțelor dezinfectante sunt organismele în forma vegetativă: bacterii, fungi, protozoare și virusurile cu înveliș lipidic. Relativ rezistente la substanțele dezinfectante sunt *Mycobacteriile* și virusurile nude, iar endosporii bacterieni și mulți dintre fungi sunt foarte rezistenți (2,8,9). Substanțele dezinfectante folosite în laboratorul de microbiologie sunt: derivați fenolici, derivați de clor-hipoclorit, cloramina (Secusept, Pursept), alcool etilic (70-96%), Big – Spray (etanol, propanol), etc. în laboratoarele de microbiologie sterilizarea se obține prin mai multe tehnici: caldura uscată (aer cald, flambare, incinerare); caldura umedă (autoclavare) radiații ultraviolete (lămpi germicide); filtrare (filtre HEPA, Milipore–0,22μm). Controlul eficienței sterilizării se efectuează prin metode chimice și bacteriologice (*Bacillus stearothermophilus* și *Bacillus subtilis*).

B. Siguranța echipamentului (bariere primare)

Personalul din laborator trebuie să respecte următoarele reguli: purtarea obligatorie a echipamentului individual de protecție în timpul activității și păstrarea separată a hainelor de exterior; interzicerea consumului de alimente și băuturi și a fumatului în incinta laboratorului; efectuarea controlului medical periodic precum și vaccinarea conform programelor naționale de sănătate; cunoașterea riscului potențial reprezentat de microorganismele manipulate, a căilor de patrundere în organism și a metodelor corecte de limitare a accesului la porțile de intrare. Cele mai importante măsuri de protecție pentru personal sunt: reducerea formării de picături sau de aerosoli în timpul prelucrării probelor biologice și purtarea echipamentului de protecție, întrucât porțile de intrare sunt reprezentate de mucoase (nazală, orală, oculară, bucală) și pielea lezată. Echipamentul de

protecție adecvat este reprezentat de halate, măști faciale (3M), ochelari de protecție panoramici, capișoane, mănuși, cotiere, papuci de unică folosință (4,11,12).

În cadrul barierelor primare sunt incluse și boxele de siguranță antiepidemică. Boxele din clasele I și II se folosesc pentru manipularea microorganismelor din grupul II și III de risc (laboratoare clinice și laboratoare cu regim restrictiv), iar boxele din clasa III pentru manipularea microorganismelor din grupul IV de risc.

C. Facilități (bariere secundare)

Pentru construcția și instalațiile laboratorului sunt recomandate următoarele exigențe: pereți interiori netezi, cu suprafața lavabilă, care permit spălarea și dezinfectarea periodică; tavan neted, fără profile care rețin praf; pavimente fără șanțuri, fisuri, lavabile, ușor de dezinfectat; uși cu deschidere spre culoar; instalații de gaze naturale, electrică, de apă curentă rece și caldă, aer condiționat; iluminare corectă-lumină naturală directă și tuburi fluorescente, fixate pe tavan; chiuvete din materiale necorozive cu surse de apă caldă și rece, rezervoare pentru săpun lichid și prosoape din hârtie de unică folosință; uneori stație de spălare

automată a ochilor și robinete de apă cu deschidere automată.

Mobilierul – de preferat de tip modular trebuie confecționat din materiale rezistente, ușor de curățat și dezinfectat; mesele de lucru trebuie să fie prevazute cu blat neted, neinflamabil, impermeabil, necoroziv; dulapurile sunt fie suspendate la perete, fie la o distanță minimă de 15-20 cm de la podea. Traficul în laborator poate fi restricționat sau controlat funcție de nivelul de biosiguranță al laboratorului.

În echipamentul specific un loc deosebit este ocupat de pupinele, care asigură sterilizarea uscată pentru sticlăria de laborator și de autoclave, care asigură sterilizarea cu vapori sub presiune a mediilor lichide și solide cât și a deșeurilor infecțioase. Folosirea boxelor de siguranță antiepidemică de clasa I, II sau III este recomandată în funcție de nivelul de biorisc al laboratorului, iar lucrul pe masa deschisă este permis doar în laboratoarele de nivel I sau II.

Coordonatorul laboratorului de microbiologie este răspunzător de implementarea și respectarea măsurilor de protecție antiepidemică specifică, a măsurilor generale de protecție a muncii, cât și a măsurilor de prevenire și stingere a incendiilor în incinta laboratorului clinic.

BIBLIOGRAFIE:

1. **August M., Hindler J.A., Huber T.W., Sewell D.L.** – Quality Control and quality assurance practices în clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C., Cumitech 3A.
2. **Buiuc D., Marian Negut** – 1999. Tratat de Microbiologie Clinică. Editura Medicală, 1990, pg. 43- 72.
3. **Canton R** – Rolul Laboratorului de Microbiologie în supravegherea bolilor infecțioase. Alertă și răspuns. Spitalul Universitar Ramon y Cajal. Madrid. Spain. *Clinical Microbiology Infectious*. 11. (Suppl. 1): 3-8, 2005.
5. **C.D.C. – N.I.H** – Biosafety în microbiological and biomedical laboratories, U. S. Department of Health and Human services, Center for diseases control, National Institutes of Health, Washington D.C., 1984
6. **Dorobat Olga** – Metode de laborator pentru identificarea agentilor etiologici ai armelor biologice, cap. E, pag. 118- 136. Ludovic Paun. Bioterorismul și armele biologice, 2003, Ed. Amaltea.
7. **Henckal EA, Teska JD, Ludwig EA et al.** – Current laboratory methods for biological threat agent identification. *Clinics în Laboratory Medicine*. 2001, 21, 661.
8. **Henchal EA, Ibrahim MS** – Evaluation of polymerase chain reaction assays for identifying biological agents. în Stopa PI, Bartoszeze MA. Rapid Methods for Analysis of Biological Materials în the Environment. Amsterdam. Olanda. 2000, pag. 239.
9. **Laboratory Biosafety Manual** – WHO, Third edition. pg 7-65.
10. **Martin B.G., Moore B., McLendon W.W** – Organization and management of the clinical laboratory. în J. B. Henry, G.A. Threatte (editors). Administration of the Clinical laboratory. W.B. Lannners Company, Philadelphia, 1991, pp. 1307-1320.
11. **Miller J.M., Holmes H.T** – Specimen collection, transport and storage. în P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pealler, F.C. Tenover. R.H. Yolken (editors). Manual of Clinical Microbiology, 6-th edition. American society for Microbiology, Washington D.C., 1995, pg 19- 32.
12. **Richmond JY, McKinney RW (ed)** – Biosafety în Microbiological and Biomedical Laboratories, ed. 4. Washington DC, US Government Printing Office, 1999.
13. **Richmond J.Y., Shanna L. Nesby** – O'Dell. Biosafety în Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 4th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fourth Edition, may 1999.
14. **W.H.O.** – Laborator biosafety manuel. World Health organization. Geneva, 1983.