

PIANO D'AZIONE GLOBALE PER IL CONTENIMENTO DI LABORATORIO DEI POLIOVIRUS SELVAGGI

Traduzione documento

WHO GLOBAL ACTION PLAN FOR LABORATORY CONTAINMENT OF WILD POLIOVIRUSES

Sommario

Questo documento fornisce un piano d'azione sistematico e globale per prevenire la trasmissione dei poliovirus selvaggi dai laboratori alla comunità.

Una volta raggiunta l'eradicazione della polio, l'unica fonte restante di virus selvaggio sarà costituita dai laboratori esistenti nel mondo. La manipolazione in sicurezza e, da ultimo, il contenimento massimo dei poliovirus e dei materiali potenzialmente infettivi presenti nei laboratori sarà quindi cruciale.

Sino ad oggi, il problema della biosicurezza per i poliovirus è stato minimo. Infatti l'immunizzazione universale con i vaccini –inattivato o IPV od orale o OPV- ha ridotto il rischio di malattia per gli operatori dei laboratori e per il pubblico in generale. Le tecnologie correnti e le pratiche di biosicurezza hanno ulteriormente ridotto i rischi di contaminazione ambientale con poliovirus.

La probabilità di una infezione da poliovirus associata al laboratorio è minima, ma le conseguenze di una infezione diventano maggiori col trascorrere del tempo. L'accidentale reintroduzione dei poliovirus selvaggi dal laboratorio alla comunità dopo l'interruzione della trasmissione naturale rappresenta una minaccia all'eradicazione della poliomielite. Il rischio per la salute pubblica di una reintroduzione accidentale di poliovirus selvaggio una volta cessata la vaccinazione sarà enorme.

Occorre perciò localizzare i laboratori che detengono materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggio ed assicurarsi che tali materiali vengano adeguatamente contenuti nei laboratori, ovvero resi non infettivi, o vengano distrutti. A questi scopi si correla il **Global Action Plan**, che si compone di 3 fasi:

Fase Pre-eradicazione

Corretta manipolazione di materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi (BSL-2/polio).

La fase pre-eradicazione si riferisce al periodo durante il quale il poliovirus selvaggio continua a circolare.

In questa fase vi sono 3 obiettivi critici:

1. Le Nazioni debbono identificare e sviluppare un inventario dei laboratori che conservano materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi
2. I laboratori devono istituire un aumentato livello di biosicurezza delle procedure – livello-2 – (BSL-2/polio) per la manipolazione in sicurezza di questi materiali infettivi o potenzialmente infettivi
3. Le Nazioni devono cominciare a pianificare per la messa in opera dei requisiti di biosicurezza previsti per la fase post-eradicazione globale.

Il completamento di tutti e tre gli obiettivi sopra citati è vincolante per la certificazione di una regione come libera da polio.

Fase post-eradicazione globale

Elevato contenimento dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi (BSL-3/polio): da iniziare 1 anno dopo il rilevamento dell'ultimo poliovirus selvaggio nel mondo

La fase post eradicazione globale comincia 1 anno dopo il rilevamento dell'ultimo poliovirus selvaggio nel mondo, quando si presume che sia cessata ogni trasmissione umana.

Tutti i laboratori in possesso di materiale infettivo o potenzialmente infettivo devono adottare una o più delle seguenti opzioni:

1. mettere in opera le procedure di contenimento (BSL-3/polio), **oppure**
2. trasferire i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi in appositi depositi designati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, **oppure**
3. rendere non più infettanti i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi, ovvero distruggerli, seguendo procedure adeguate.

Tutte le azioni di biosicurezza devono essere messe in opera e ne deve essere documentata la completezza prima che possa essere attuata la certificazione di eradicazione globale della polio.

Fase Post-immunizzazione con OPV

Massimo contenimento (BSL-4) dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi ed alto contenimento (BSL-3/polio) dell'OPV e dei virus OPV-derivati: da cominciare quando cessa l'immunizzazione con OPV.

Questa fase inizia con la cessazione mondiale dell'immunizzazione con OPV e con il conseguente rapido aumento del numero di bambini suscettibili all'infezione. I requisiti di biosicurezza per i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi aumentano da BSL-3/polio a BSL-4, mentre i requisiti per OPV e virus derivati dall'OPV aumentano da BSL-2/polio a BSL-3/polio per prevenire la reintroduzione e la potenziale circolazione di questi virus nella popolazione non più immunizzata. Devono essere sviluppate procedure per controllare o distruggere OPV non utilizzati sulle cliniche, nei centri di immunizzazione, negli ambulatori medici, ed in altri siti.

Pubblicazione del Piano

Questo documento illustra le premesse, il razionale e le strategie per assicurare che la biosicurezza dei laboratori sia adeguata al rischio per la comunità derivante da un'eventuale inavvertita reintroduzione dei poliovirus.

La piena collaborazione e l'impegno di tutte le nazioni sono necessarie per ottenere l'eradicazione dei poliovirus selvaggi e per la messa in atto del **Piano d'azione globale** per assicurare che i poliovirus non saranno più una minaccia per le generazioni future. Questo piano sarà effettivo il 1 gennaio 2000.

POLIOMIELITE

Descrizione

La polio, o poliomielite, è una malattia infettiva causata da poliovirus appartenenti al genere Enterovirus. Esistono tre sierotipi di poliovirus: 1, 2, e 3. Le cellule umane sono provviste di specifici recettori proteici ai quali i poliovirus possono aderire e quindi penetrare nelle cellule suscettibili. Il virus infetta le cellule dell'orofaringe, le tonsille, i linfonodi del collo e l'intestino tenue. L'infezione evolve attraverso cicli di replicazione virale, risultando nella distruzione delle cellule infette. Una volta instaurata l'infezione, i poliovirus possono raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso la barriera emato-encefalica, tramite il torrente ematico o attraverso le fibre nervose.

Quando soggetti non immuni sono esposti a poliovirus selvaggi si possono avere infezioni inapparenti prive di sintomi, forme paucisintomatiche, meningiti asettiche, o forme paralitiche. Solo l'1% circa delle infezioni si manifesta come malattia riconoscibile clinicamente. Il periodo di incubazione varia da 4 a 35 giorni, tipicamente 7-14 giorni. I sintomi clinici iniziali possono includere febbre, affaticamento, mal di testa, vomito, costipazione (o meno comunemente diarrea), indolenzimento del collo e dolore agli arti. La moltiplicazione virale distrugge i motoneuroni responsabili dell'attivazione muscolare. Queste cellule nervose non rigenerano, risultando nell'inabilità funzionale dei muscoli interessati.

Modalità di trasmissione

Il virus si trasmette da persona a persona. I poliovirus possono essere diffusi tramite goccioline respiratorie originate dal tratto respiratorio superiore durante i primi giorni di infezione. Più comunemente le persone infette eliminano grandi quantità di particelle virali con le feci, dalle quali il virus può essere trasmesso indirettamente o direttamente ad altre persone.

I poliovirus in natura

Nelle persone immunocompetenti i poliovirus possono essere rilevati nell'orofaringe per 1-2 settimane, nel sangue per circa 1 settimana, nelle feci per 1-2 mesi dopo l'infezione iniziale. Nei casi fatali i poliovirus possono essere rilevati nelle feci, nel contenuto intestinale, nei linfonodi, nel tessuto cerebrale e nel midollo spinale. Poiché meno dell'1% delle infezioni esita in poliomielite, molti bambini "sani" diffondono il virus durante periodi di alta prevalenza.

Nei soggetti immunocompetenti non esiste lo stato di portatore a lungo termine, indipendentemente dal decorso clinico. E' stata però dimostrata la persistente eliminazione di poliovirus derivati dal vaccino orale in soggetti immunodepressi con deficit dell'immunità umorale.

L'uomo rappresenta la sola riserva animale di poliovirus, benché anche i primati più in alto nella scala evolutiva possano essere infettati sperimentalmente e talvolta naturalmente. I poliovirus

presenti nell'ambiente sono diretta conseguenza di infezioni recenti per la polio della comunità umana.

La contaminazione del suolo con poliovirus si verifica attraverso la fecalizzazione degli ambienti vicino alle abitazioni, la fertilizzazione delle messi con contenuti fognari o con acque reflue non adeguatamente trattate, e con le acque di scarico riciclate per l'irrigazione. I poliovirus nelle acque reflue riflettono la prevalenza dell'infezione nella comunità. La contaminazione delle acque superficiali può avvenire attraverso la scarica di acque reflue non trattate o inadeguatamente trattate o percolate attraverso suolo contaminato.

Sopravvivenza dei poliovirus

I poliovirus sono resistenti all'inattivazione tramite i comuni disinfettanti di laboratorio come alcool e cresoli. Sono prontamente inattivati da soluzioni diluite di formaldeide o cloro libero residuo, raggi ultravioletti, calore ed essiccamento. L'inattivazione può essere rallentata dalla contemporanea presenza di materia organica.

La velocità di inattivazione virale in natura è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. L'infettività dei poliovirus nel suolo decresce del 90% ogni 20 giorni in inverno ed ogni 1,5 giorni in estate. Una simile riduzione del 90% a temperatura ambiente avviene ogni 26 giorni nelle acque reflue, ogni 5,5 giorni nell'acqua potabile ed ogni 2,5 giorni nell'acqua di mare.

In condizioni di laboratorio, il virus contenuto in campioni clinici o ambientali può sopravvivere per molti anni alle temperature di congelamento, per molti mesi in condizioni di refrigerazione, e per alcuni giorni a temperatura ambiente. Il virus è rapidamente distrutto dall'esposizione a temperature di 50°C o più, dall'autoclavaggio o dall'incenerimento.

Vaccini antipoliomielitici

L'immunità protettiva per la poliomielite è conferita attraverso l'immunizzazione o l'infezione naturale. L'immunità è sierotipo-specifica. La protezione nei confronti della malattia è associata con la presenza di anticorpi circolanti nel sangue, che prevengono la diffusione del virus al sistema nervoso centrale. La protezione verso l'infezione è associata alla presenza sia di anticorpi circolanti nel sangue che di anticorpi secretori presenti nell'intestino e nel tratto respiratorio superiore.

Sia il vaccino attenuato orale (OPV) che il vaccino inattivato (IPV) conferiscono protezione verso la malattia, differendo però nella modalità e nell'estensione della protezione dell'infezione. IPV stimola la produzione di anticorpi protettivi nel torrente ematico ma fornisce solamente una protezione transitoria e di basso livello verso l'infezione a livello intestinale. Perciò IPV fornisce un'effettiva protezione individuale nei confronti della malattia, ma solo una protezione parziale nei confronti dell'infezione da poliovirus selvaggi. Nei soggetti immunizzati con IPV, il virus selvaggio

può ancora moltiplicarsi nelle cellule intestinali ed essere eliminato nelle feci. Ciononostante l'uso di IPV di qualità adeguata ha posto sotto controllo la poliomielite in paesi con buoni livelli sanitari. L'OPV induce immunità sia circolante che secretoria e fornisce una protezione durevole contro la malattia ed una protezione transitoria nei confronti dell'infezione. L'immunizzazione con OPV crea un'effettiva barriera alla trasmissione del poliovirus selvaggio. I virus vaccinali possono essere eliminati per settimane attraverso le feci. In circa un caso ogni 2,5 milioni di dosi di OPV somministrate, il virus vaccinale vivo attenuato può causare paralisi o nel vaccinato o in un contatto.

Eradicazione della polio

Prima dell'avvento della vaccinazione negli anni '50, la poliomielite aveva diffusione mondiale. L'immunizzazione è risultata altamente efficace nel ridurre il numero di casi in tutto il mondo. La polio può essere eradicata attraverso l'interruzione della trasmissione interumana mediante il potenziamento dell'immunizzazione routinaria dei bambini in molti Paesi, ed attraverso l'uso strategico dei vaccini nei programmi di eradicazione della polio.

Non esiste evidenza di uno stato persistente di portatore di poliovirus selvaggi, né esistono animali o insetti serbatoi, ed il virus può sopravvivere solo per brevi periodi nell'ambiente. Primati non umani (gorilla e scimpanzé) sono suscettibili all'infezione ed alla malattia, ma tali popolazioni non sono sufficientemente ampie per sostenere la trasmissione dei poliovirus in assenza di infezioni umane. L'uomo è la sola riserva naturale di poliovirus. Quindi, una volta che i poliovirus saranno privati dell'ospite umano attraverso l'immunizzazione, essi si estingueranno rapidamente. La continua diminuzione dell'incidenza di poliomielite in molti paesi e la progressiva scomparsa di poliovirus suggeriscono che l'interruzione della trasmissione interumana e la conseguente eradicazione siano a portata di mano.

Evidenza di infezioni associate al laboratorio

A meno di un anno di distanza dall'ultimo caso di vaiolo acquisito naturalmente nel 1977, due casi di vaiolo furono registrati nel Regno Unito, entrambi collegati ad un laboratorio nella Scuola medica universitaria di Birmingham. Il caso indice era un fotografo medico che lavorava in una camera oscura sita al piano al di sopra del laboratorio che effettuava ricerche con il virus del vaiolo. Il secondo caso era la madre del fotografo. Il caso indice presumibilmente acquisì l'infezione attraverso l'aria fuoriuscita dalla conduttura di servizio che collegava lo studio fotografico al laboratorio che lavorava con il virus del vaiolo. Furono registrate due morti; il paziente indice, come risultato dell'infezione, ed il direttore del laboratorio che si tolse la vita in seguito all'incidente. La polio non è il vaiolo; sia i virus che l'epidemiologia delle malattie dagli stessi causate sono del tutto differenti. Come per il vaiolo, comunque, la trasmissione dei poliovirus selvaggi dal laboratorio

alla comunità può avvenire attraverso la contaminazione ambientale o attraverso un addetto al laboratorio infetto. Il vaiolo si diffonde lentamente, è clinicamente evidente e può essere contenuto tramite vaccinazioni strategiche; i poliovirus selvaggi, invece, possono diffondersi rapidamente dal laboratorio ad una popolazione non immunizzata, creando infine una tragedia di enormi proporzioni nei confronti della salute pubblica.

Benché teoricamente possibile, non esiste evidenza diretta di trasmissione di poliovirus all'esterno di un laboratorio attraverso scarichi contaminati rilasciati nelle acque reflue, rifiuti solidi trasportati ai depositi, o aria diffusa nelle vicinanze. Non esiste inoltre diretta evidenza di trasmissione dell'infezione ad altri attraverso la pelle o gli abiti contaminati dei lavoratori addetti. Tali vie di diffusione sono di difficile documentazione tra persone con elevati livelli di immunità naturale o da immunizzazione. Più prontamente documentate sono le infezioni poliomielitiche dei laboratoristi, con rischio potenziale di trasmissione alla comunità.

Lavorare in un laboratorio con poliovirus era un tempo considerato di gran lunga più pericoloso che occuparsi di pazienti poliomielitici, con un teorico tasso di attacco di 2 per 50-75 addetti di laboratorio. Dal 1941 al 1976 furono registrati un totale di 12 casi di poliomielite da laboratorio, con 2 morti. I dati di 7 dei 12 casi non sono stati pubblicati. La maggioranza di tali casi occorsero in epoche pre-vaccinali e prima dell'avvento delle colture cellulari. I 5 casi pubblicati vennero riportati negli anni '40, epoca nella quale un gran numero di ricercatori si erano interessati allo studio delle malattie nell'uomo. In quei tempi il personale dei laboratori veniva sempre più esposto ai tessuti o agli escreti di soggetti poliomielitici o a primati infettati con virus poliomielitici di recente isolamento dall'uomo.

Il primo rapporto di una infezione da laboratorio venne pubblicato nel 1941 relativamente ad un caso di poliomielite presumibilmente acquisito durante le operazioni di preparazione di tessuti infetti, per l'inoculazione in scimmie. Due anni più tardi, due laboratoristi vennero accidentalmente infettati con il ceppo prototipo Lansing (Armstrong) mentre tentavano di infettare topi di laboratorio. Altri due casi documentati di poliomielite in laboratoristi furono fatali: uno negli Stati Uniti ed uno in Sudafrica.

Nessun caso venne riportato nei successivi 10 anni. In un'analisi recente dei potenziali rischi di infezioni associate alle pratiche di laboratorio, il rischio di poliomielite non viene neanche menzionato. La scarsità di dati di infezioni poliomielitiche associate a pratiche di laboratorio verificatisi dopo l'introduzione del vaccino testimonia l'efficacia della vaccinazione ed il miglioramento nelle strutture, nelle tecnologie e nelle procedure di laboratorio. Ci si aspetta quindi che infezioni poliomielitiche siano rare nel personale di laboratorio.

Nonostante i progressi in tema di biosicurezza negli ultimi 40 anni, recenti evidenze indicano comunque che esiste il rischio potenziale di trasmissione dei poliovirus dal laboratorio alla comunità. Nel 1992 fu documentata la trasmissione di un ceppo selvaggio di tipo 1, usato per la produzione di IPV, da un lavoratore operante nelle strutture di produzione del vaccino al figlio di 18

mesi. Il bimbo soffriva di gastroenterite quando, per caso, il virus selvaggio usato per produrre IPV fu isolato dalle sue feci. In un altro episodio un bambino risultò infettato con un ceppo prototipo di tipo 3, comunemente usato in laboratorio a scopo di ricerca o per produzione di vaccini; la fonte di questa infezione non venne identificata.

I casi illustrati dimostrano che la reintroduzione di poliovirus selvaggi dal laboratorio alla comunità non immunizzata rappresenta un rischio serio ed inaccettabile.

Benché IPV sia altamente efficace nel prevenire la malattia, il suo uso non è in grado di prevenire infezioni inapparenti nel personale di laboratorio. OPV fornisce una barriera più efficace, ma infezioni inapparenti possono altresì avvenire anche in questo caso. In conseguenza, in assenza di vaccini pienamente efficaci, devono essere intraprese precauzioni di biosicurezza straordinarie per la prevenzione delle infezioni del personale di laboratorio e per la prevenzione del conseguente rischio di diffusione alla comunità.

Definizione di poliovirus

I **poliovirus** sono identificati tramite saggi standard di neutralizzazione con antisieri specifici. I tre sierotipi di poliovirus costituiscono un unico gruppo genetico di enterovirus umani che provocano l'infezione legandosi ad uno specifico recettore cellulare (PVR:CD155). Altri enterovirus possono essere associati occasionalmente con casi di paralisi flaccida acuta, ma trattasi di virus diversi dai poliovirus che non si legano al PVR.

I poliovirus selvaggi posseggono la capacità di circolare indefinitamente all'interno della popolazione umana suscettibile. Studi molecolari hanno dimostrato che le sequenze capsidiche dei poliovirus selvaggi vengono conservate durante la trasmissione, mentre le sequenze non capsidiche e non codificanti possono essere cambiate mediante ricombinazione con altri enterovirus durante la circolazione. Perciò l'identificazione di "poliovirus" tramite sequenze al di fuori della regione capsidica può essere arbitraria. Nella regione capsidica dei ceppi OPV risiedono importanti determinanti del fenotipo attenuato, che non si riscontrano nelle sequenze capsidiche dei poliovirus selvaggi.

La distinzione tra ceppi selvaggi e OPV non si basa sulla neurovirulenza. Alcuni ceppi selvaggi e di riferimento mostrano una bassa neurovirulenza quando saggiati in animali di laboratorio, ma risultano geneticamente simili a virus circolanti associati con malattia paralitica. Ceppi attenuati che non siano stati approvati per l'uso nei vaccini orali per la polio dalle autorità nazionali di controllo, devono essere considerati come poliovirus selvaggi.

La definizione dei poliovirus è la seguente (tab. 1).

Tabella 1: definizione di poliovirus.

Poliovirus

Enterovirus umani con 3 sierotipi ben definiti, che infettano le cellule tramite un recettore specifico (PVR:CD155)

Poliovirus selvaggi

Isolati o ceppi di riferimento derivati da poliovirus che abbiano o si crede abbiano circolato persistentemente nella comunità

Ceppi di vaccino orale di poliovirus

Poliovirus attenuati approvati per l'uso nei vaccini orali dalle autorità nazionali di controllo

Poliovirus derivati da vaccino

Progenie di ceppi approvati per vaccino orale poliomielitico.

Materiale infettivo per poliovirus selvaggio

Poliovirus selvaggi possono essere presenti nelle feci e nei campioni faringei; meno comunemente nel sangue; raramente nel liquido cefalorachidiano di pazienti con infezioni paralitiche e non paralitiche. Nelle forme fatali, i poliovirus selvaggi possono essere presenti nelle feci, nel contenuto intestinale, nei linfonodi, nel tessuto cerebrale e nel midollo spinale. I poliovirus possono essere ritrovati nel sangue durante la prima settimana di infezione, prima che compaiano gli anticorpi neutralizzanti, ma si ritrovano raramente nel sangue dopo la comparsa dei primi segni di interessamento del sistema nervoso centrale. Qualsiasi materiale clinico derivante da soggetti con infezione nota o sospetta e che sia stato trattato e conservato in condizioni che preservino il virus è definito come materiale infettivo, anche qualora la presenza effettiva del virus non sia stata confermata.

Altri materiali infettivi comprendono isolati di poliovirus selvaggi, ceppi di riferimento, e tutti i prodotti di laboratorio che soddisfino la definizione di poliovirus selvaggio (tab.1). Sono anche inclusi campioni di acque reflue ambientali o campioni di acqua contaminati o sospetti di contaminazione, animali di laboratorio infetti e campioni di animali infetti.

I primati non umani e i topi transgenici infetti rappresentano un rischio poiché il virus può essere eliminato e trasmesso a soggetti umani suscettibili. I topi transgenici infettati con poliovirus selvaggio devono quindi essere stabulati secondo le raccomandazioni dell'OMS.

Nelle tab.2 e 3 sono riportate definizioni ed esempi di materiali infettivi.

Tabella 2: definizioni di materiali infettivi per poliovirus selvaggi

Materiale clinico infettivo:

ogni materiale clinico proveniente da casi confermati o sospetti di poliomielite

Materiale di ricerca infettivo:

- tutti i prodotti di laboratorio derivati da poliovirus che abbiano sequenze capsidiche derivate da poliovirus selvaggi
- RNA o cDNA a tutta lunghezza contenenti sequenze capsidiche derivate da poliovirus selvaggi
- Cellule persistentemente infettate da ceppi di poliovirus le cui sequenze capsidiche siano derivate da poliovirus selvaggi

Materiali ambientali infettivi:

- acque reflue o campioni d'acqua contenenti o sospetti di contenere poliovirus selvaggi

Animali infetti:

- ogni animale di laboratorio infettato con ceppi contenenti sequenze capsidiche derivate da poliovirus selvaggi, specialmente topi transgenici PVR infettati con poliovirus selvaggi

Tabella 3: esempi di materiali infettivi per poliovirus selvaggi

campioni faringei, fecali, ematici e liquorali da casi sospetti o confermati di polio, raccolti per:

- diagnosi di laboratorio
- studi epidemiologici sui poliovirus

reperti autoptici/bioptici (non fissati) da casi sospetti o confermati di polio

stock di virus selvaggi

- ceppi prototipo usati come controllo
- isolati
- pannelli di controllo
- semenze virali per vaccini inattivati

materiali di ricerca con sequenze capsidiche dei poliovirus selvaggi

- derivati dei poliovirus
- RNA o cDNA a tutta lunghezza di poliovirus
- Cellule infette

Campioni di acque reflue e di acque contaminate o con sospetta contaminazione con poliovirus selvaggi

Campioni derivanti da animali di laboratorio infettati con il virus selvaggio (primati non umani, topi transgenici)

Materiali potenzialmente infettivi

Materiali clinici ed ambientali compatibili con la possibile presenza di poliovirus raccolti per qualsiasi scopo diagnostico o di ricerca in tempi e luoghi di endemicità dei poliovirus selvaggi devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Tutti i suddetti materiali clinici ed ambientali, mantenuti in laboratorio in condizioni tali da preservare i poliovirus, devono essere attentamente valutati per la loro potenziale infettività. Possono essere inclusi campioni fecali o secrezioni respiratorie raccolte per qualsiasi scopo, incluse inchieste epidemiologiche.

Ogni raccolta di materiali deve essere valutata per determinare la possibilità della presenza di poliovirus selvaggi, in base al trattamento ed alla conservazione effettuati, al paese di origine, all'anno, all'epoca dell'isolamento dell'ultimo poliovirus selvaggio indigeno in quel paese, al tipo di campione. Campioni fecali congelati prelevati da bambini in periodi epidemici possono contenere grandi quantità di poliovirus infettivi. Campioni sierici e liquorali raccolti routinariamente non contengono verosimilmente livelli di poliovirus sufficienti (seppure ne contengono) per provocare infezioni e non vanno considerati infetti.

Non devono essere considerati infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi i materiali clinici o ambientali se conservati senza refrigerazione per tre mesi o più, se refrigerati per 1 anno o più, se inattivati al calore, se trattati con disinfettanti che inattivano i poliovirus, o se analizzati e riscontrati negativi per la presenza di poliovirus.

Definizioni ed esempi di materiali potenzialmente infettivi sono forniti nelle tabelle 4 e 5.

Tabella 4: Definizione di materiali di laboratorio potenzialmente infettivi

Materiali di laboratorio potenzialmente infettivi:

materiali clinici quali feci e tamponi faringei; campioni ambientali raccolti per qualsiasi scopo in un tempo ed in un'area geografica in cui si suppone o si è certi essere presenti poliovirus selvaggi e mantenuti nelle condizioni note per conservare i poliovirus.

Tabella 5: esempi di materiali potenzialmente infettivi raccolti in epoche ed aree geografiche in cui era nota la presenza di poliovirus selvaggi *

materiali clinici

- feci
- tamponi faringei

acque reflue e campioni di acque non trattate

prodotti di laboratorio

- isolati in colture cellulari, non tipizzati, simili agli enterovirus
- isolati di poliovirus non identificati

* tali materiali devono essere considerati come non infetti qualora conservati senza refrigerazione per 3 mesi o più, refrigerati per almeno 1 anno o più, inattivati al calore, trattati con disinfettanti antivirali, o analizzati e riscontrati negativi per la presenza di enterovirus.

Enti/istituzioni e laboratori con materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

Materiali infettivi

I laboratori posseggono materiale infettivo per poliovirus selvaggi per diverse ragioni. Molti laboratori diagnostici e di igiene pubblica mantengono isolati di poliovirus e campioni clinici come documentazione di passate indagini di casi endemici o importati di poliomielite. Alcuni conservano numerosi ceppi virali da inserire come controlli nei saggi, come materiale di riferimento, o per il loro valore storico. Le istituzioni didattiche posseggono i poliovirus selvaggi da impiegare per le esercitazioni. I laboratori di ricerca virologica detengono stock di poliovirus o di materiali infettivi per studi sulle proprietà biologiche, biochimiche o genetiche del virus. Altri laboratori di ricerca accumulano materiali potenzialmente infettivi come documentazione di studi già effettuati o per studi futuri. Alcuni laboratori ambientali detengono materiali contaminati o poliovirus selvaggi per verificare l'efficacia dei composti virucidi. Le ditte di produzione dei vaccini posseggono ceppi selvaggi per la produzione di IPV o per la verifica della qualità dell'OPV. Anche i laboratori nazionali di controllo possono avere tali ceppi.

L'identificazione dei laboratori che detengono materiali infettivi per virus poliomielitici selvaggi rappresenta una sfida formidabile, ma non insormontabile. I canali disponibili per l'identificazione dei laboratori che detengono i poliovirus selvaggi nei paesi sviluppati includono l'impegno di infrastrutture nazionali sanitarie e di ricerca, di registri dei laboratori, di enti accreditati, di organizzazioni professionali e di reti nazionali ed istituzionali di sicurezza biologica.

Non tutti questi canali potrebbero essere disponibili nei paesi in via di sviluppo. In ogni caso, il numero di laboratori biomedici in grado di detenere tali materiali a lungo termine nei paesi in via di sviluppo è considerevolmente più basso e di solito noto alle autorità nazionali ed all'OMS.

I laboratori che più verosimilmente detengono materiali infettivi per poliovirus sono o sono stati laboratori che si sono occupati di poliovirus/enterovirus, i laboratori facenti parte della rete OMS per i poliovirus, i laboratori di produzione dei vaccini antipolio, ed i laboratori diagnostici (vedi tabelle 6 e 7)

Laboratori che si occupano di poliovirus/enterovirus: i laboratori che lavorano attivamente con i poliovirus sono relativamente pochi rispetto alla totalità dei laboratori microbiologici. La maggioranza di tali laboratori sono noti tramite i Ministeri della Sanità, le società professionali, la comunità di ricerca sui poliovirus, ovvero possono essere identificati attraverso i rapporti dell'OMS relativi all'isolamento dei poliovirus o attraverso le pubblicazioni scientifiche.

La rete globale OMS dei laboratori sulla polio: questa rete consiste di oltre 140 Laboratori Nazionali, Laboratori di Riferimento Regionale, e Laboratori di Riferimento Specializzati, istituita per facilitare la sorveglianza mondiale sui poliovirus. I Laboratori Nazionali (ed in molti paesi i laboratori sub-nazionali) controllano i campioni rettali dei casi di paralisi flaccida acuta per il rilevamento di poliovirus e l'identificazione dei sierotipi. I Laboratori Regionali di Riferimento confermano l'identità dei poliovirus isolati dai Laboratori Nazionali e determinano se il virus sia selvaggio o derivato da vaccino. Un Laboratorio Regionale di Riferimento può anche fungere da Laboratorio Nazionale per il proprio paese o per altri paesi che non posseggano laboratori propri. I Laboratori di Riferimento Specializzati provvedono ad effettuare diverse attività di riferimento, incluso il sequenziamento genomico di isolati di poliovirus importanti da un punto di vista epidemiologico. Tale sequenziamento fornisce in un certo senso "l'impronta digitale" dei poliovirus, che consente poi di distinguere con certezza tra casi importati ed indigeni, di stimare l'associazione temporale tra isolati diversi, di identificare i contaminanti di laboratorio.

I laboratori della rete OMS possono essere utili fonti di suggerimenti per gli altri laboratori nazionali e regionali che potrebbero essere in possesso di materiali infettivi o potenzialmente tali. I laboratori OMS servono anche da modello per l'applicazione di procedure appropriate nel manipolare in sicurezza poliovirus selvaggi e per il loro contenimento.

Laboratori di produzione di vaccini antipolio: i laboratori produttori IPV ed OPV sono pochi e sono noti alle autorità nazionali regolatorie ed all'OMS.

Laboratori diagnostici ed altri tipi di laboratorio: alcuni laboratori virologici non menzionati sopra possono aver trattato nel passato poliovirus/enterovirus ovvero possono occasionalmente effettuare saggi diagnostici, ricerche o esercitazioni didattiche con poliovirus. Questi laboratori possono detenere poliovirus e materiali infettivi in depositi frigoriferi. Tali laboratori possono essere presenti in numerose organizzazioni, incluse istituzioni di salute pubblica, enti nazionali di controllo, strutture cliniche, servizi commerciali, istituzioni accademiche e di ricerca. Poliovirus

selvaggi possono anche essere posseduti da collezioni di ceppi a livello nazionale, internazionale, privato o industriale; tali organizzazioni possono essere individuate attraverso la società internazionale delle collezioni di colture e ceppi.

Tabella 6: Enti/istituzioni con laboratori che potrebbero possedere materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

<p>Enti di controllo biologico</p> <ul style="list-style-type: none">- Nazionali/regionali <p>Istituzioni di ricerca biomedica</p> <ul style="list-style-type: none">- Nazionali/regionali/commerciali/non-profit <p>Centri di riferimento per colture cellulari e ceppi virali</p> <ul style="list-style-type: none">- Nazionali/istituzionali <p>Enti ambientali</p> <ul style="list-style-type: none">- Nazionali/regionali/locali <p>Ospedali</p> <p>Enti militari</p> <ul style="list-style-type: none">- Sanitari/di ricerca <p>Produttori</p> <ul style="list-style-type: none">- Di prodotti biologici/di vaccini <p>Enti di sanità pubblica</p> <ul style="list-style-type: none">- Nazionali/regionali/locali- Di sicurezza alimentare <p>Università</p>
--

Materiali potenzialmente infettivi

Di più difficile individuazione sono i laboratori in possesso di campioni clinici, epidemiologici, di ricerca, ambientali, raccolti per scopi diversi in epoche ed in aree geografiche endemiche per poliovirus selvaggi e quindi potenzialmente contaminati.

Nei paesi industrializzati, i materiali potenzialmente infettivi potranno essere ritrovati nei laboratori di ricerca con programmi internazionali. Nei paesi in via di sviluppo, i laboratori che più verosimilmente possono possedere tali materiali dovranno essere identificati in base ai rispettivi programmi di ricerca. In ogni caso l'assenza di tali materiali in altri laboratori, qualsiasi sia la loro dimensione, non può essere presunta. La ricerca di materiali potenzialmente infettivi deve includere tutti i laboratori medici/biologici che conservano tali materiali in condizioni tali da preservare l'infettività dei poliovirus (tabelle 4 e 5).

Gli enti/istituzioni e i laboratori che potrebbero possedere materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi sono elencati nelle tabelle 6 e 7.

Tabella 7: laboratori che potrebbero possedere materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

Laboratori di microbiologia*
Di controllo
Diagnostici
Produttori
Di ricerca
Didattici
Laboratori di patologia**
Laboratori di gastroenterologia**
Laboratori nutrizionali**
Laboratori ambientali**
* comprende laboratori di batteriologia, micologia, parassitologia e virologia
** comprende le tipologie di laboratorio elencate alla voce microbiologia per quanto applicabili

Censimento dei laboratori e costituzione degli inventari dei materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

L'attuazione del piano nella fase pre-eradicazione del **Piano d'azione globale** richiede due passi critici: il censimento di tutti i laboratori medici/biologici che potrebbero essere in possesso di materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi e la costituzione di un sistema di inventario globale dei laboratori che posseggono tali materiali.

Lo scopo del **Censimento globale** è costituire un **Inventario globale** dei laboratori con materiali infettivi o potenzialmente tali, tracciare il **Piano d'azione globale** per assicurare la manipolazione in sicurezza di tali materiali ed effettuare lo smaltimento di quei materiali non più necessari al laboratorio.

Il **Censimento globale** è gerarchico, iniziando dalla notifica dell'OMS e procedendo attraverso i Ministeri della Sanità, gli enti ed istituzioni, ed i laboratori. Poiché molti dei laboratori che potrebbero possedere i materiali di cui trattasi sono al di fuori del sistema sanitario, il completamento dell'esame richiederà che il Ministero della Sanità si avvalga della cooperazione di altri ministeri, includendo la Pubblica Istruzione, la Difesa e l'Ambiente.

Lo scopo dell'inventario è documentare la locazione ed il tipo dei materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi conservati nei laboratori; soddisfare i requisiti richiesti affinché il paese possa essere certificato come indenne da polio; mantenere un elenco aggiornato dei laboratori cui

andrà notificato di attivare le procedure di contenimento dopo un anno dall'isolamento dell'ultimo poliovirus selvaggio.

I dati per l'inventario sono ottenuti dal **Censimento globale**, iniziando con un'accurata ricerca da parte di tutti i laboratori per ogni materiale che risponda alla definizione di materiale infettivo o potenzialmente infettivo per poliovirus selvaggi. I dati ottenuti dai laboratori devono essere trasmessi da parte degli enti/istituzioni all'**Inventario nazionale** allestito da ogni paese. I dati di tale inventario, infine, vengono forniti alla **Commissione nazionale per la certificazione dell'eradicazione della poliomielite** così come al competente Ufficio Regionale OMS.

Una guida ulteriore su come condurre l'esame e su come costituire l'inventario è fornita nelle *Linee guida per attivare la fase pre-eradicazione del Piano d'azione globale per il contenimento di laboratorio dei poliovirus selvaggi: censimento dei laboratori/costituzione degli inventari* (tale documento può essere ottenuto scrivendo al "Global Polio Laboratory Coordinator, Vaccines and Biologicals, Global Poliomyelitis Eradication Initiative, 20 Avenue Appia, CH-1211 Geneva 27, Svizzera).

Requisiti di biosicurezza

Il principio base della biosicurezza è assicurare che le tecniche microbiologiche degli addetti, la progettazione, la costruzione e le caratteristiche di sicurezza del laboratorio siano adeguate al rischio rappresentato dall'agente infettivo nei confronti degli operatori e della comunità.

Per convenzione il rischio relativo agli agenti infettivi viene classificato in gruppi di rischio che vanno da 1 (il più basso livello di rischio per i lavoratori del laboratorio e per la comunità) a 4 (maggiore rischio). Quattro livelli di biosicurezza (BSL) corrispondono a questi quattro gruppi di rischio; i requisiti di biosicurezza diventano progressivamente più stringenti all'aumentare del rischio (tab.8).

I poliovirus selvaggi sono classificati nel gruppo di rischio 2. La motivazione per l'inserimento in tale gruppo di basso rischio è la pressoché totale immunizzazione della popolazione con OPV e/o IPV. Il livello di biosicurezza 2 (BSL-2) è quello minimo attualmente raccomandato in tutti i paesi. Con l'approssimarsi dell'eradicazione della poliomielite (pre-eradicazione), affinché sia assicurata l'adeguata manipolazione in sicurezza dei poliovirus selvaggi e dei materiali potenzialmente infettivi, il livello BSL-2, da ora in poi indicato come BSL-2/polio, dovrà essere aumentato attraverso l'adozione di pratiche specifiche descritte nella tabella 10.

Una volta raggiunta l'eradicazione della polio (fase post-eradicazione globale), i poliovirus selvaggi presenti nei laboratori costituiranno una categoria speciale, nel senso che presenteranno un rischio minimo o nullo nei confronti dei lavoratori immunizzati, ma rappresenteranno un potenziale rischio al successo dell'eradicazione qualora la trasmissione avvenisse nella comunità. I livelli di

biosicurezza per i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi aumenterà perciò da BSL-2/polio a BSL-3/polio (alto contenimento).

Quando infine cesserà l'immunizzazione (fase post-immunizzazione OPV), il numero di soggetti non immunizzati, suscettibili all'infezione, andrà rapidamente crescendo nel mondo. La possibile trasmissione dei poliovirus selvaggi dai laboratori alla comunità diverrà allora un rischio sanitario di proporzioni globali. I requisiti di biosicurezza per i materiali infettivi e potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi aumenteranno conseguentemente dal livello di alto contenimento (BSL-3/polio) al livello di massimo contenimento (BSL-4). Un corrispondente aumento dei requisiti di biosicurezza da BSL-2/polio a BSL-3/polio sarà richiesto anche per virus OPV e derivati da OPV, affinché sia ridotto il rischio teorico di circolazione di questi virus in popolazioni non immunizzate.

I principali criteri per i livelli BSL-2/polio, BSL-3/polio e BSL-4 sono riassunti nella tabella 9.

Tabella 8: gruppi di rischio e livelli di biosicurezza

Gruppo di rischio	Livello del rischio	Descrizione del gruppo di rischio	Livello di biosicurezza
1	rischio basso o nullo per l'individuo e la comunità	microorganismi che difficilmente provocano malattie nell'uomo o negli animali	di base - BSL-1
2	rischio individuale moderato, basso rischio per la comunità	patogeni che possono provocare malattie nell'uomo o negli animali, ma che difficilmente rappresentano un serio rischio per gli operatori del laboratorio, la comunità, il bestiame d'allevamento, l'ambiente. L'esposizione in laboratorio può causare serie infezioni, ma sono disponibili trattamenti e misure preventive efficaci ed il rischio di diffusione dell'infezione è limitato	di base - BSL-1
3	rischio individuale alto, basso rischio per la comunità*	patogeni che di solito causano gravi malattie nell'uomo o negli animali ma che generalmente non diffondono da un individuo infetto ad altri soggetti. Sono disponibili trattamenti e misure preventive efficaci	Alto contenimento - BSL-3
4	alto rischio per l'individuo e per la comunità*	patogeni che di solito causano gravi malattie nell'uomo o negli animali e che possono essere facilmente trasmessi da un individuo all'altro, direttamente od indirettamente. Non sono generalmente disponibili trattamenti e misure preventive efficaci	Massimo contenimento - BSL-4
<p>* i poliovirus selvaggi presentano un rischio particolare. Una volta raggiunta l'eradicazione (fase post-eradicazione globale) rappresenteranno un rischio nullo o trascurabile per l'individuo immunizzato, ma un rischio crescente per la comunità. Al cessare dell'immunizzazione con OPV (fase post-immunizzazione OPV), essi rappresenteranno un rischio nullo o trascurabile per l'operatore immunizzato, ma costituiranno un rischio eccezionalmente elevato per la comunità non immunizzata.</p>			

Tabella 9: Sommario dei livelli di biosicurezza per i materiali infettivi e/o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

Fase di eradicazione

	Fase pre-eradicazione BSL-2/polio	Fase post-eradicazione globale BSL-3/polio	Fase post-OPV immunizzazione BSL-4
Idonee tecniche microbiologiche (Allegato 1)	+	+	+
Personale			
- immunizzato	+	+	+
- sottoposto a valutazione medica		+	+
- con idonei indumenti protettivi	+	+	+
Strutture			
- Laboratori separati		+	+
- Accesso limitato	+	+	+
- Superfici idrorepellenti		+	+
- Sigillabili per decontaminazione		+	+
- A pressione negativa		+	+
- Filtri di aspirazione HEPA		+	+
- Cappe di sicurezza biologica I o II	+	+	
- Cappe di sicurezza biologica III o tute a pressione positiva			+
- Autoclavi: in loco	+	+	
nella stanza			+
a doppia entrata			+
- Effluenti liquidi trattati			
Poliovirus selvaggi			
- Conservati in sicurezza con accesso controllato ed usati solo quando indispensabili	+	+	+
Elencati nell'Inventario nazionale	+	+	+

Fase pre-eradicazione

Manipolazione in sicurezza dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi (BSL-2/polio)

Lo scopo dell'aumento dei requisiti di biosicurezza per i poliovirus selvaggi dal livello attuale BSL-2 al livello BSL-2/polio è di ridurre ulteriormente il rischio di trasmissione dal laboratorio alla comunità in un'epoca in cui i casi di polio stanno diminuendo o non vengono più registrati in molte parti del mondo.

Il BSL-2 consiste nell'adozione delle buone pratiche di laboratorio in un laboratorio microbiologico di base, come descritto nel Manuale di biosicurezza dei laboratori dell'OMS del 1993. Il trasporto in sicurezza dei campioni e dei materiali di laboratorio, procedure idonee per la disinfezione e la sterilizzazione, e l'uso di attrezzature progettate per eliminare o ridurre i rischi fanno parte delle buone pratiche da adottare in un laboratorio microbiologico (Allegato 1).

Il laboratorio microbiologico di base consiste di una struttura fornita di autoclave in loco e di cappa di biosicurezza di classe I o II per il contenimento di tutti gli aerosol potenzialmente infettivi. Un sistema di ventilazione meccanica con flusso di aria verso l'interno è pure desiderabile (Allegato 2).

Requisiti aggiuntivi del livello BSL-2/polio per la manipolazione di poliovirus o materiali potenzialmente infettivi includono: l'interruzione dell'uso non necessario dei poliovirus selvaggi; lo smaltimento dei materiali infettivi o potenzialmente tali non essenziali; l'istituzione di un registro aggiornato sugli stocks di poliovirus conservati, lo stoccaggio di poliovirus e dei materiali infettivi in luoghi sicuri; il solo uso di ceppi identificati o di materiali inattivati non infettivi nel caso fosse necessario l'uso di antigeni di poliovirus selvaggi; limitazione dell'accesso al laboratorio alle sole persone che devono lavorare con i poliovirus selvaggi e che sono adeguatamente vaccinate. Il laboratorio BSL-2/polio è descritto nella tabella 10.

Requisiti dei laboratori in fase pre-eradicazione

Tutti i laboratori che trattano materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi dovranno immediatamente adempiere ai requisiti BSL-2/polio e fare domanda per essere inseriti nell'Inventario Nazionale.

I laboratori che non desiderino conservare i poliovirus selvaggi dovranno o distruggere tutti i materiali infettivi o potenzialmente infettivi tramite autoclavaggio o incenerimento (Allegato 3), oppure trasferire tali materiali selezionati secondo le raccomandazioni OMS (Allegato 4) ad un deposito temporaneo designato dall'OMS.*

* l'elenco di tali depositi è fornito da Global Polio Laboratory Coordinator, Vaccines and Biologicals, Global Poliomyelitis Eradication Initiative, 20 Avenue Appia, CH-1211 Geneva 27, Svizzera.

Tabella 10: requisiti del livello di biosicurezza BSL-2/polio

- Vengono adottate le buone pratiche per il laboratorio microbiologico (Allegato 1)
- Le strutture soddisfano gli standard per i laboratori base BSL-2 (Allegato 2)
- L'accesso al laboratorio è limitato
- Le persone che accedono al laboratorio sono state completamente immunizzate per la polio
- Non vengono usati poliovirus selvaggi se poliovirus vaccinici attenuati, antigeni inattivati o enterovirus non-polio possono servire allo stesso scopo, ad esempio per i test di neutralizzazione anticorpale.
- Tutti gli stocks di poliovirus e di materiali potenzialmente infettivi vengono eliminati se non più necessari per scopi di ricerca o altro
- Si attiva un sistema di controllo interno per tutti i poliovirus selvaggi posseduti dal laboratorio (inventario aggiornato, buona tenuta dei registri)
- I poliovirus selvaggi sono conservati in aree separate, sicure e con accesso limitato
- Se è necessario utilizzare ceppi di referenza o stocks di poliovirus selvaggi, sono usati solo virus facilmente identificabili con metodi molecolari.
- Per lo smaltimento dei poliovirus selvaggi e dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi sono impiegati metodi di sterilizzazione e/o di incenerimento appropriati (Allegato 3).

Fase successiva all'eradicazione globale

Elevato contenimento dei materiali infettivi e potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi (BSL-3/polio): da iniziare ad un anno di distanza dall'ultimo isolamento di poliovirus selvaggio.

Lo scopo del BSL-3/polio è di ridurre ulteriormente il rischio di trasmissione dei poliovirus dal laboratorio agli operatori e/o alla comunità quando i poliovirus non circoleranno più in nessuna parte del mondo, ma sarà ancora praticata l'immunizzazione universale. Il laboratorio BSL-3/polio include tutte le buone pratiche di laboratorio microbiologico descritte per il laboratorio BSL-2/polio. I principali ulteriori requisiti delle strutture includono la separazione del laboratorio dai corridoi comuni; doppie porte di entrata; porte a chiusura automatica e chiudibili a chiave; finestre, se presenti, sigillate in permanenza; superfici idrorepellenti e di facile pulitura; camere sigillabili per la decontaminazione; pressione negativa rispetto all'ambiente; filtri HEPA; presenza di un'autoclave nel laboratorio, preferibilmente a doppia entrata. La lista completa dei requisiti di una struttura BSL-3/polio è descritta nel Manuale di biosicurezza dei laboratori dell'OMS.

Prima dello smaltimento tutti i materiali infettivi o potenzialmente infettivi devono essere autoclavati o trattati chimicamente. Eventuali schizzi di materiali infettivi devono essere trattati con disinfettanti e deve essere posta la massima cura affinché materiali infettivi o potenzialmente tali non vengano

scaricati nelle fogne. Tutti i laboratori che detengono o manipolano materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus in condizioni BSL-3/polio devono essere inseriti nell'Inventario dell'ente/istituzione e nell'Inventario Nazionale. Un sommario della progettazione e delle attrezzature di un laboratorio di elevato contenimento è fornito nella tab. 11.

Requisiti dei laboratori nella fase successiva all'eradicazione globale

Tutti i laboratori che desiderino conservare materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi devono attivare al più presto le procedure di contenimento di livello BSL-3/polio, al più tardi entro un anno dall'isolamento dell'ultimo poliovirus selvaggio. Tutte le operazioni connesse alla biosicurezza devono essere attivate e ne deve essere documentata la completezza prima che possa essere presa in considerazione la certificazione di eradicazione globale della polio.

I laboratori che desiderino classificarsi come strutture BSL-3/polio e che desiderino conservare materiali infettivi per poliovirus selvaggi devono essere inclusi nell'Inventario dell'ente/istituzione, nell'Inventario Nazionale e nell'Inventario Regionale.

I laboratori che non desiderino adeguarsi al livello BSL-3/polio devono rendere non infettivi i poliovirus selvaggi ed i materiali potenzialmente infettivi, ovvero devono distruggerli mediante autoclavaggio o incenerimento (Allegato 3)

In alternativa, tali laboratori possono contattare un deposito BSL-3/polio tra quelli designati dall'OMS per il trasferimento e la conservazione di materiali selezionati.

Tabella 11- strutture di elevato contenimento (BSL-3/polio): sommario della progettazione e delle attrezzature di laboratorio

Oltre a tutti i requisiti delle strutture BSL-2/polio:

- Il laboratorio è separato dalle aree all'interno dell'edificio a traffico non limitato
- Le porte di accesso sono a chiusura ed a serratura automatica
- Le superfici delle pareti, pavimenti e soffitti sono idrorepellenti e di facile pulitura
- La stanza del laboratorio è sigillabile per consentire la decontaminazione. I sistemi di conduzione dell'aria sono costruiti per permettere la disinfezione gassosa.
- Le finestre sono chiuse e sigillate
- Il sistema di fornitura dell'acqua è dotato di valvole antiriflusso
- Nella struttura è mantenuta una pressione negativa tramite sistemi di filtri aspiranti HEPA e con ultra filtri HEPA, meccanici, individuali e diretti verso l'interno
- Nella stanza del laboratorio dovrebbe essere disponibile una autoclave per la decontaminazione del materiale di scarto infetto

Fase successiva all'immunizzazione con OPV

Massimo contenimento (BSL-4) dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi, ed elevato contenimento (BSL-3/polio) di OPV e virus derivati da OPV: da iniziare al cessare dell'immunizzazione con OPV.

I requisiti di biosicurezza per i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi aumentano dal livello BSL-3/polio al livello BSL-4 al cessare dell'immunizzazione. L'aumento del livello di contenimento è da collegarsi alle potenziali conseguenze di una inavvertita trasmissione del virus polio selvaggio dal laboratorio ad una popolazione non immune rapidamente in aumento. Il livello BSL-4 può essere ottenuto con un sistema di contenimento primario consistente nell'impiego di "tute ventilate" a pressione positiva o con una cappa di biosicurezza a sistema chiuso BSC-III. Un laboratorio BSL-4 con "tute ventilate" richiede una progettazione speciale per fornire la ventilazione idonea all'interno delle tute, una doccia chimica, ed uno speciale sistema di smaltimento dei rifiuti. La costruzione e la gestione di tale struttura è complessa, costosa e rappresenta un investimento di grande entità.

I laboratori che già soddisfano i requisiti BSL-3/polio possono adeguarsi al BSL-4 installando una cappa a flusso laminare BSC-III, e soddisfacendo gli ulteriori requisiti per il laboratorio di massimo contenimento, come sottolineato nella tabella 12. I requisiti BSL-4 sono descritti nel Manuale OMS della biosicurezza dei laboratori.

I requisiti aggiuntivi di sicurezza per i poliovirus comprendono:

- L'accesso al laboratorio è controllato da serrature, chiavi e controllo delle entrate degli addetti
- La documentazione e i computers che la contengono sono sotto chiave. La documentazione comprende la validazione delle procedure di sicurezza e le entrate ai laboratori.
- I virus sono conservati in laboratori chiusi a chiave ed in congelatori chiusi a chiave. Gli inventari custoditi sono mantenuti responsabilmente con la documentazione.
- Le procedure di trasporto nazionale ed internazionale sono adeguate a quanto stabilito nelle Linee guida OMS per il trasporto in sicurezza delle sostanze infettive e dei campioni diagnostici. Il personale viene istruito sull'uso di appropriate procedure in merito al trasporto da e verso il laboratorio, alla preparazione della documentazione richiesta, ed alla raccolta delle autorizzazioni necessarie.
- I controlli amministrativi includono la nomina di un responsabile per la sicurezza, di una commissione di biosicurezza ed il controllo che tutto il personale del laboratorio sia immune nei riguardi dei poliovirus.

Nella fase successiva all'immunizzazione, i requisiti di biosicurezza per l'OPV e per i virus derivati dall'OPV aumenteranno al livello BSL-3/polio per il rischio teorico derivante da un'eventuale circolazione di questi virus in popolazioni non immunizzate.

Requisiti dei laboratori nella fase post immunizzazione con OPV

Tutti i laboratori che lavorano con materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi dovranno immediatamente attivare i requisiti di massimo contenimento (BSL-4) dal momento in cui venga notificata la cessazione dell'immunizzazione con OPV. Ogni laboratorio che lavori con virus OPV dovrà attivare procedure di elevato contenimento (BSL-3/polio). Le strutture di produzione del vaccino IPV dovranno raggiungere il massimo contenimento e verranno valutate caso per caso. Solo i laboratori che soddisfano questi requisiti saranno autorizzati a detenere o lavorare con poliovirus e materiali potenzialmente infettivi.

I laboratori BSL-3/polio che non desiderino adeguarsi al livello BSL-4 possono mantenere l'OPV e virus derivati dall'OPV, ma devono smaltire tutti i materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi tramite autoclavaggio o incenerimento (Allegato 3), o trasportare selezionati materiali in accordo con le raccomandazioni dell'OMS (Allegato 4) ad un deposito temporaneo appositamente designato dall'OMS.

Tabella 12 - strutture di massimo contenimento (BSL-4): sommario della progettazione e dell'attrezzatura di laboratorio

Oltre a tutti i requisiti delle strutture BSL-3/polio:

- L'entrata e l'uscita di merci e personale avvengono attraverso un sistema a barriera d'aria o box con aperture interbloccanti. All'entrata il personale dovrà effettuare un completo cambio di abiti; all'uscita il personale dovrà effettuare una doccia prima di indossare nuovamente i propri vestiti.
- Tutti gli effluenti liquidi provenienti dalla struttura di laboratorio dovranno essere resi sicuri prima dello scarto finale
- una autoclave a doppia porta, con sistema passante, deve essere disponibile per la sterilizzazione degli indumenti di laboratorio, dei rifiuti e dei materiali.
- E' in funzione in loco un sistema di contenimento primario, consistente in uno o più dei seguenti:
 - cappe di biosicurezza di classe III
 - "tute ventilate" a pressione positiva. Una speciale doccia di decontaminazione chimica è fornita per il personale che lascia l'area dove sono impiegate tali tute
- Per i campioni ed i materiali sono installate aperture di entrata a barriera d'aria o serbatoi ad immersione

Considerazioni sulla biosicurezza in casi particolari

Laboratori di produzione di vaccini: l'IPV è prodotto con ceppi selvaggi non attenuati. Il massimo contenimento dei poliovirus selvaggi e dei materiali potenzialmente infettivi nelle strutture di produzione dell'IPV rappresenta una sfida speciale per i grandi volumi e l'alta concentrazione dei virus manipolati. Ogni struttura deve essere ispezionata su base individuale dalle autorità nazionali in collaborazione con l'OMS, per la definizione di procedure adeguate al rischio corrente.

Laboratori di sanità pubblica e di diagnostica clinica: la sorveglianza dei poliovirus sarà attiva per molti anni dopo l'interruzione della trasmissione dei virus selvaggi e la cessazione dell'immunizzazione con OPV. L'esame diagnostico continuerà in laboratori designati, sotto condizioni BSL-2/polio. I tests saranno effettuati usando come controlli virus vaccinali e prodotti non infettivi dei poliovirus, rispettivamente nelle fasi Post Eradicazione Globale e post-Immunizzazione con OPV. I tests effettuati nei laboratori per determinare la presenza di poliovirus in campioni clinici o ambientali non costituiscono per la comunità un rischio maggiore di quello già presente nella comunità se fosse ritrovata la presenza di poliovirus.

I requisiti di biosicurezza per tutti i tipi di laboratorio sono riassunti nella tabella 13.

Tabella 13 : requisiti dei laboratori che detengono o che lavorano con polio virus				
		Fase di eradicazione		
		Pre-eradicazione	Post-eradicazione globale	Post-immunizzazione con OPV
		virus selvaggi circolanti	Nessun virus selvaggio circolante da almeno un anno	immunizzazione con OPV interrotta
tutti i laboratori	vaccino OPV/virus vaccino-derivati	BSL*-2/polio	BSL-2/polio	BSL-3/polio
	virus selvaggi	BSL-2/polio	BSL-3/polio	BSL-4
circostanze speciali	laboratori di sanità pubblica e clinici (solo tests diagnostici)	BSL-2/polio	BSL-2/polio**	BSL-2/polio ⁺
	produzione di vaccini	OPV	BSL-2/polio	BSL-2/polio**
		IPV	BSL-2/polio	BSL-3/polio
<p>* Livello di biosicurezza (vedi tabella 9)</p> <p>** Nessun virus vivo selvaggio usato come controllo in tests diagnostici o di riferimento</p> <p>+ Nessun virus vivo usato come controllo in tests diagnostici</p> <p>++ Verrà richiesto il massimo contenimento a ciascuna delle strutture producenti vaccini caso per caso</p>				

Allegato 1

Buone tecniche microbiologiche

- I campioni sono maneggiati in sicurezza
- Non è permesso il pipettaggio a bocca
- Pipette e pipettatrici automatiche sono usate in sicurezza
- Viene evitata la dispersione di materiali infettivi
- Viene evitato il contatto di materiali infettivi con pelle ed occhi
- Viene evitata l'ingestione di materiali infettivi
- La separazione del siero è condotta in sicurezza
- Le centrifughe sono utilizzate in sicurezza
- Omogenizzatori, agitatori e sonicatori sono utilizzati in sicurezza
- I macinatori di tessuti sono utilizzati in sicurezza
- I frigoriferi sono mantenuti ed utilizzati in sicurezza
- Le provette contenenti materiali infettivi sono aperte in sicurezza
- I materiali infettivi sono conservati in sicurezza
- Idonee precauzioni sono adottate per sangue e altri fluidi corporei
- Campioni e materiali infettivi sono trasportati in sicurezza
- Appropriate disinfezione e sterilizzazioni sono adottate
- Le mani vengono lavate dopo ogni procedura e prima di lasciare il laboratorio
- Vengono indossati camici di laboratorio durante il lavoro in laboratorio
- E' proibita la conservazione di cibo o bevande nel laboratorio e la conservazione di qualsiasi recipiente contenente materiale infettivo
- E' proibito mangiare, bere e fumare all'interno del laboratorio.

Allegato 2

Il livello base di biosicurezza 2 delle strutture (BSL-2)

- Viene fornito uno spazio ampio per la conduzione in sicurezza del lavoro di laboratorio e per la pulizia e la manutenzione
- Pareti, soffitti e pavimenti sono facilmente pulibili
- l'illuminazione è adeguata per tutte le attività
- lo spazio di conservazione è adeguato a contenere scorte di materiale per uso immediato
- lavamani con acqua corrente, se possibile, sono forniti in ogni stanza del laboratorio, preferibilmente vicino alla porta
- una autoclave (o adatta pentola a pressione) è disponibile nello stesso edificio del laboratorio
- strutture per conservare gli indumenti esterni ed articoli personali, per mangiare e bere sono disponibili all'esterno delle aree lavorative
- e' disponibile una fonte di acqua affidabile e di buona qualità. Non ci sono connessioni tra acqua usata in laboratorio ed acqua da bere
- un generatore di emergenza è desiderabile per il supporto ad attrezzature essenziali come incubatori, cappe di biosicurezza, congelatori, e similari
- pipettatrici automatiche sono disponibili per sostituire il pipettaggio a bocca
- cappe di biosicurezza sono disponibili per
 - Procedure che facilmente producono aerosol, incluse centrifugazione, tritramento, mescolamento, agitazione o mescolamento vigorosi, disagregazione con ultrasuoni, apertura di contenitori di materiali infettivi la cui pressione interna può essere diversa dalla pressione ambientale
 - Manipolazione di elevate concentrazioni o di grandi volumi di materiali infettivi
- Centrifughe con rotori di sicurezza sigillabili sono disponibili per centrifugare elevate concentrazioni o grandi volumi di materiali infettivi nel laboratorio. Tali rotori devono essere riempiti e svuotati in cappe di biosicurezza.
- Provette e bottiglie con tappi a vite sono disponibili per contenere campioni e colture positive
- Autoclavi sono disponibili per sterilizzare i materiali contaminati

Allegato 3

Metodi per lo smaltimento di materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

Sterilizzazione (uso di autoclavi)

Il calore umido sotto pressione è il più efficace metodo di sterilizzazione dei materiali di laboratorio.

- Tutte le colture ed i materiali contaminati dovranno normalmente essere autoclavati, prima dello smaltimento, in contenitori a tenuta, ad esempio sacchetti di plastica autoclavabili,
- I sacchetti di plastica dovranno essere aperti affinché il vapore penetri nel contenuto
- Dopo essere stati autoclavati, i materiali potranno essere posti in contenitori per il trasporto all'inceneritore o ad altri punti di smaltimento

Incenerimento

- L'incenerimento è il metodo di scelta per lo smaltimento finale di rifiuti contaminati, incluse carcasse di animali di laboratorio, da effettuare preferibilmente dopo l'autoclavaggio.
- L'incenerimento dei materiali infettivi è un'alternativa all'autoclavaggio solo se:
 - l'inceneritore è sotto il controllo del laboratorio
 - l'inceneritore è fornito di efficienti mezzi di controllo della temperatura e di camera di combustione secondaria
- I materiali destinati all'incenerimento, anche se previamente autoclavati, dovrebbero essere trasportati all'inceneritore in sacchetti, preferibilmente di plastica
- Gli addetti all'inceneritore dovranno ricevere appropriate istruzioni in merito al caricamento ed al controllo della temperatura dell'inceneritore

Smaltimento finale

Lo smaltimento dei rifiuti medici e di laboratorio è soggetto a diverse norme nazionali. In generale, le ceneri derivanti dall'incenerimento possono essere trattate allo stesso modo dei normali rifiuti domestici ed essere quindi rimossi dalle autorità locali. I rifiuti autoclavati possono essere smaltiti tramite incenerimento in altra sede o in discariche pubbliche autorizzate

Allegato 4

Requisiti per il trasporto in sicurezza dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi

Il trasporto dei materiali infettivi o potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi dovrebbe seguire le regole di trasporto dello IATA per le sostanze infettive che interessano l'uomo.

Le seguenti istruzioni sono estratte dalle *linee guida per il trasporto in sicurezza delle sostanze infettive e dei campioni diagnostici*, WHO, 1997 (tale documento è disponibile su Internet, al sito <http://www.who.int/emc/biosafety.html>). Si prega di riferirsi al documento completo per definire accordi per le modalità di trasporto dei materiali infettivi e potenzialmente infettivi per poliovirus selvaggi.

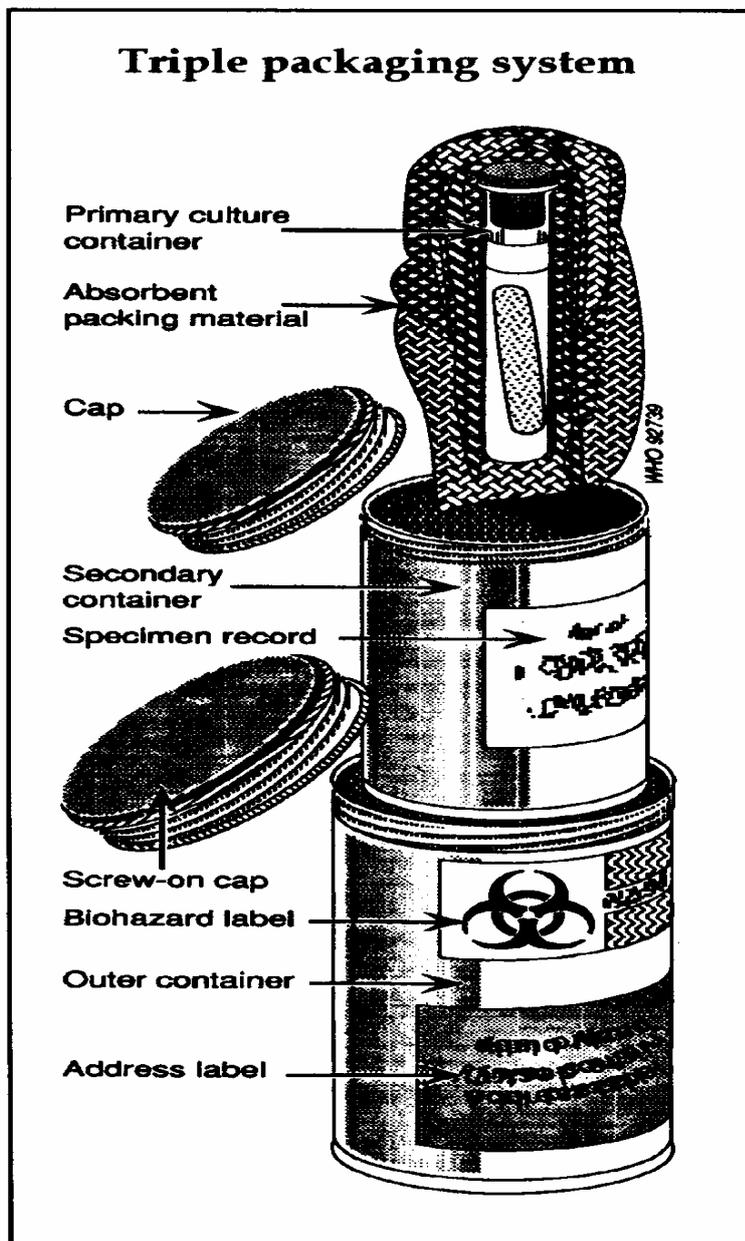
Gli attuali requisiti di confezionamento per le sostanze infettive consistono in un triplo sistema descritto come segue e mostrato nella figura seguente.

Sistema di base del confezionamento triplo

Il sistema consiste dei tre strati di seguito indicati:

1. **contenitore primario.** Contenitore etichettato, stagno, ermetico, contenente il campione
2. **contenitore secondario.** Secondo contenitore, consistente, stagno, ermetico, che contiene e protegge il primo contenitore
3. **imballaggio esterno di spedizione.** Imballaggio esterno di spedizione che contiene i contenitori primario e secondario

Moduli con le informazioni sui campioni, lettere ed altri tipi di informazioni che identificano o descrivono il campione, lo speditore ed il ricevente, dovranno essere fissate con nastro adesivo all'esterno del contenitore secondario.



Il trasporto a mano di sostanze infettive è severamente proibito dai vettori aerei internazionali, come attraverso l'uso di valigie diplomatiche.

Se il trasporto viene effettuato con aerei passeggeri, la quantità netta massima di sostanze infettive che possono essere contenute in un imballaggio esterno da spedizione è di 50 mL o 50 grammi. Tale limite è di 4 L o 4 Kg per il trasporto via cargo o tramite altri mezzi.

L'etichettatura dell'imballaggio esterno per la spedizione di sostanze infettive deve includere i seguenti elementi:

1. l'etichetta internazionale indicante sostanza infettiva
2. una etichetta indirizzo con tutte le informazioni
3. i documenti di spedizione richiesti – ottenuti dal trasportatore e fissati all'imballo esterno
4. un permesso e/o una dichiarazione di importazione e/o esportazione laddove richiesto

5. se l'imballo esterno contiene recipienti primari eccedenti 50 mL in totale almeno due "etichette di orientamento" (freccie) dovranno essere piazzate su lati opposti del pacco a mostrare il corretto orientamento dello stesso.

E' responsabilità dello speditore assicurare corrette designazioni, impacchettamento, e documentazione di tutte le sostanze infettive e campioni diagnostici.

L'efficiente trasporto e trasferimento dei materiali infettivi richiede un buon coordinamento tra speditore, trasportatore e ricevitore (laboratorio ricevente) al fine di assicurare che il materiale venga trasportato in sicurezza e che lo stesso arrivi puntualmente ed in buone condizioni. Tale coordinamento dipende da ben consolidate comunicazioni tra le tre parti e dalla relazione tra le stesse.

Ciascuna parte ha infatti specifiche responsabilità nella spedizione.

Lo speditore

Lo speditore ha le seguenti responsabilità:

1. stipulare accordi preventivi col ricevitore dei campioni, inclusa la verifica della necessità di un eventuale permesso di importazione
2. stipulare accordi preventivi col trasportatore al fine di assicurare:
 - che alla spedizione verrà garantito un appropriato trasporto
 - che la spedizione (se possibile con trasporto diretto) venga effettuata per la via più diretta, evitando arrivi durante il weekend
3. preparare la necessaria documentazione inclusi permessi, bollettini e documenti di spedizione
4. notificare al ricevitore gli accordi effettuati per il trasporto, con il dovuto anticipo rispetto al tempo previsto per l'arrivo.

Il trasportatore

Il trasportatore è responsabile di:

1. fornire allo speditore i necessari documenti di spedizione e le istruzioni per il loro completamento
2. fornire suggerimenti allo speditore in merito al corretto impacchettamento
3. assistere lo speditore nell'organizzare nel modo più diretto il trasporto e quindi nel confermarlo
4. mantenere ed archiviare la documentazione per la spedizione e il trasporto
5. monitorare le condizioni richieste per la conservazione idonea dei materiali spediti durante il transito
6. notificare al ricevitore ogni ritardo previsto o reale nel transito

Il ricevitore

La parte ricevente è responsabile di:

1. ottenere le necessarie autorizzazioni da parte delle autorità nazionali per l'importazione dei materiali
2. fornire allo speditore i necessari permessi di importazione, lettere di autorizzazione, o altri documenti, richiesti dalle autorità nazionali
3. predisporre la più puntuale ed efficiente raccolta all'arrivo ed inoltre
4. dichiarare immediatamente il ricevimento allo speditore

La spedizione non dovrebbe essere effettuata finchè:

- non siano stati predisposti accordi tra speditore, trasportatore e ricevitore
- il ricevitore abbia confermato, in accordo con le autorità nazionali, che il materiale può essere legittimamente importato
- il ricevitore abbia confermato che la consegna del pacco non subirà ritardi.

Dettagliate informazioni sulla risposta e sulle misure di sicurezza di emergenza negli incidenti associati al trasporto possono essere trovati a pagina 52-54 del *Manuale di biosicurezza di laboratorio dell'OMS*.