

CAPITOLO 2

REQUISITI AMBIENTALI E CONTROLLI, DISEGNO DEL LABORATORIO

PRINCIPI GENERALI

Sono di seguito descritti i requisiti ambientali che un laboratorio di PMA deve possedere e le relative modalità con cui effettuare i controlli, con riferimento ai decreti legislativi 6 novembre 2007 n. 191 e 25 gennaio 2010 n. 16. Sono inoltre descritte le caratteristiche progettuali di un laboratorio di PMA, tenendo in considerazione i requisiti di sicurezza previsti dalle norme di riferimento generali. Il capitolo non tiene conto di eventuali ulteriori requisiti strutturali e ambientali previsti da normative regionali specifiche.

INDICE

- **Introduzione**
- **Conta delle particelle aerotrasportate**
 - Strumenti per la conta delle particelle aerotrasportate
 - Numero di rilevazioni
 - Volume d'aria da campionare
 - Posizionamento dello strumento per la conta delle particelle aerotrasportate
 - Frequenza dei controlli
- **Conta delle contaminazioni microbiologiche**
 - Metodi di campionamento
 - Terreni di coltura utilizzati
 - Numero di rilevazioni
 - Siti del laboratorio dove effettuare la conta microbiologica
 - Frequenza dei controlli
- **Strutturazione di un laboratorio di PMA**
- **Referenze**

REQUISITI AMBIENTALI E CONTROLLI, DISEGNO DEL LABORATORIO

Normative di riferimento relative ai requisiti ambientali nei laboratori dei centri di PMA

D.Lgs. 191/2007
D.Lgs. 16/2010

Metodiche e tempistiche da utilizzare per il monitoraggio dei requisiti ambientali

Descrizione delle modalità di esecuzione dei controlli (conta delle particelle aerotrasportate e conta delle contaminazioni microbiologiche) e relative tempistiche

Strutturazione di un laboratorio di PMA

Caratteristiche strutturali che in fase di progettazione un laboratorio deve prevedere per facilitare il rispetto dei limiti imposti per legge

INTRODUZIONE

Il laboratorio di PMA è realizzato secondo una tecnica per cui l'atmosfera del locale è tenuta in costante sovrappressione, controllata con gradiente crescente verso le zone a maggior pulizia, allo scopo di evitare l'immissione di flussi inversi potenzialmente inquinanti. La filtrazione e la distribuzione dell'aria, i materiali costruttivi, le procedure di comportamento del personale, di pulizia e di manutenzione sono tali da consentire il controllo di particelle solide (vitali e non vitali) presenti nell'atmosfera, in modo tale che questa concentrazione corrisponda ai livelli definiti. Il rispetto dei requisiti progettuali del laboratorio di PMA qualificato e controllato assicura qualità e sicurezza delle cellule trattate.

La zona di accesso al laboratorio PMA deve essere classificata grado D, come il laboratorio e quindi monitorata con gli stessi controlli ambientali dei parametri fisici e microbiologici.

La sala di criobiologia non è ambiente classificato GMP, a meno che non si apra direttamente nel laboratorio PMA: in tal caso deve mantenere il grado di pulizia D e quindi deve essere controllata nei parametri fisici e con i test microbiologici.

I requisiti minimi che un laboratorio per la lavorazione di cellule riproduttive deve possedere sono descritti nel decreto legislativo 25 gennaio 2010 n. 16 che fa riferimento al *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008)*.

La classificazione della qualità dell'aria deve essere effettuata all'installazione; il monitoraggio e la riqualifica devono essere effettuate con frequenza definita utilizzando:

- la conta delle particelle aerotrasportate
- la conta delle contaminazioni microbiologiche.

CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE



Nell'ambiente in cui vengono eseguite le lavorazioni è richiesta una qualità dell'aria con un numero di particelle equivalente a quelli di grado A di cui all'allegato 1 della guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (GMP), con un ambiente di fondo almeno equivalente a GMP di grado D.

Per assicurare il grado D in laboratorio, la stessa classe deve essere mantenuta anche nell'ambiente di accesso al laboratorio stesso.

Vengono di seguito riportati i limiti descritti nelle GMP Annex 1 (update 2008).

Limiti di concentrazione massima (particelle/m³ d'aria) per particelle di dimensioni maggiori o uguali alle dimensioni descritte in tabella

Grado	<i>At rest</i>		<i>In operation</i>	
	0.5 µm	5.0 µm	0.5 µm	5.0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Non definito	Non definito

Lo stato *at rest* del laboratorio vuol dire che gli strumenti sono installati e operativi, ma non è presente, all'interno del laboratorio, il personale. La valutazione della conta particellare *at rest* deve essere effettuata dopo un periodo di 15-20 minuti dalla fine delle attività.

La condizione *in operation* prevede, oltre le condizioni degli strumenti nello stato *at rest* (in funzione) che il personale sia presente e operante all'interno del laboratorio. Se le operazioni di controllo dell'aria possono essere dannose per le cellule in lavorazione, tale controllo può essere effettuato in corso di una simulazione, dove però devono essere rispettate le condizioni abituali di lavoro.

Per i laboratori di PMA deve essere effettuato un controllo particellare dell'aria *in operation* solo all'interno delle cappe a flusso laminare (grado A). Non essendo definito il limite di particelle per il grado D (vedi tabella) tale tipo di controllo non è richiesto per il locale circostante. Poiché talvolta i certificati rilasciati dalle ditte che effettuano i controlli della qualità dell'aria riportano valori riferiti alla norma ISO, riportiamo di seguito la classificazione ISO 14644-1.

Classe	0.1 µm	0.2 µm	0.3 µm	0.5 µm	1 µm	5.0 µm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1.000	237	102	35	8	-
ISO 4	10.000	2.370	1020	352	83	-
ISO 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO 7	-	-	-	352.000	83.200	2.930
ISO 8	-	-	-	3.520.000	832.000	29.300
ISO 9	-	-	-	35.200.000	8.320.000	293.000

Comparando le due tabelle si può notare che il grado A della classificazione GMP equivale circa alla classe ISO 5, mentre il grado D della classificazione GMP equivale circa, nello stato *at rest*, alla classe ISO 8.



Si consiglia di esprimere i risultati dei controlli secondo le indicazioni dell'Annex 1 delle GMP, a cui si riferisce la normativa.

STRUMENTI PER LA CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE

Lo strumento utilizzato per la conta particellare (Fig. 1) deve essere corredato da un certificato di taratura rilasciato anche dal costruttore. La taratura del costruttore deve essere eseguita ad intervalli regolari; copia del certificato di taratura deve essere rilasciata insieme ai risultati della stampata dei dati macchina.



Figura 1
Esempio di contaparticelle.

NUMERO DI RILEVAZIONI

Il numero minimo di punti di campionamento è ricavato dalla tabella in funzione della superficie della camera bianca espressa in metri quadrati. Se il valore della superficie cade tra due valori consecutivi della tabella, si deve selezionare il maggiore dei due (ISO 14644-1:2015 punto A.4.1).

Tabella dei punti di campionamento in funzione della superficie della camera bianca

Area della clean room m ² ≤	N. minimo di punti di campionamento N _L
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10

"Dove sono necessarie informazioni sulla stabilità della concentrazione delle macroparticelle, di dimensione $\geq 5 \mu\text{m}$, fare tre o più misurazioni in punti selezionati in intervalli di tempo concordati tra cliente e fornitore. (ISO 14644-1:2015 punto C.5)"

VOLUME DI ARIA DA CAMPIONARE

Per il grado A, la rilevazione per ogni singolo campione deve essere effettuata su almeno un m^3 di aria, mentre per il grado D il volume dei campioni prelevati in corrispondenza di ciascun punto deve essere pari ad almeno 2 litri, con un tempo di campionamento minimo di 1 min per ogni punto (ISO14644:2015 parte 1, punto A 4.4).

POSIZIONAMENTO DELLO STRUMENTO PER LA CONTA DELLE PARTICELLE AEROTRASPORTATE

Premesso che i parametri di numero di particelle (e anche di colonie microbiche, vedi di seguito) previsti per il grado A dalle GMP possono essere rispettati solo utilizzando una cappa a flusso laminare, a tale scopo rilevazioni della conta particellare vanno effettuate all'interno della stessa.

"La camera bianca o zona pulita è suddivisa in una griglia di sezioni di uguale superficie, il cui numero è pari al numero di punti di campionamento derivato dalla tabella. Dentro ogni sezione verrà selezionato un punto di campionamento "rappresentativo" delle caratteristiche della sezione (ISO 14644-1:2015 punto A.4.2)".

La cappa ha raggiunto la classificazione specificata per la pulizia dell'aria se il valore medio delle concentrazioni delle particelle considerate misurate in corrispondenza del punto

di campionamento non supera i limiti di concentrazione stabiliti.

Per quanto riguarda invece i punti di campionamento nell'ambiente di fondo (grado D), il responsabile del laboratorio identifica le zone critiche in cui tali rilevazioni devono essere effettuate (in vicinanza degli incubatori, delle cappe stesse, del micromanipolatore, zone di passaggio, aree potenzialmente più sporche, bocchette di immissione ed estrazione dell'aria, ecc.).

FREQUENZA DEI CONTROLLI

La frequenza dei controlli è in relazione al tipo di attività svolta (lavorazione in serie o senza soluzione di continuità).

Nel caso di lavorazione in serie e se il laboratorio chiude l'impianto di trattamento aria tra una serie e la successiva, i controlli devono essere effettuati in tempo utile per analizzare i risultati e verificare quindi la conformità della struttura prima dell'inizio della serie.

Se la verifica di grado non risultasse idonea, verrà eseguita una manutenzione straordinaria degli ambienti fino al ripristino delle condizioni richieste, che devono essere documentate.

Se invece il centro di PMA lavora senza soluzione di continuità, la verifica del rispetto dell'ambiente di fondo (grado D) ha una frequenza minima annuale.

La conta particellare all'interno delle cappe a flusso laminare (grado A) deve essere eseguita con cadenza minima semestrale. In caso di eventi particolari (contaminazioni, installazione di nuove apparecchiature...) sarà cura del responsabile del laboratorio attivare i controlli senza attendere le scadenze previste.

Limiti suggeriti per il monitoraggio della contaminazione in condizione operative

Grado	Microrganismi aerei ufc/m ³	Microrganismi per deposizione (diametro 90 mm) ufc/4 ore	Piastre per contatto (diametro 55 mm) ufc/piastra	Impronta delle 5 dita del guanto ufc/guanto
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

METODI DI CAMPIONAMENTO

- Valutazione *Air sample* (Microrganismi aerei).
Si effettua tramite campionamenti "attivi" dell'aria e a tale scopo sono utilizzati particolari aspiratori che permettono all'aria di depositare le eventuali particelle vitali sulle piastre di coltura montate sull'apparecchio (es. campionatore SAS). Volume minimo di aria prelevato: grado A = 1000 litri, grado D = 200 litri, in un tempo inferiore a 15'.
Parametro: ufc/m³.
- Valutazione *Settle plates* (Microrganismi per deposizione)
Si effettua tramite campionamenti "passivi" dell'aria utilizzando piastre di coltura del diametro di 90 mm esposte per tutta la durata della lavorazione, se questa è inferiore alle 4 ore. Se la lavorazione richiede tempi più lunghi il controllo deve essere di almeno 4 ore; tuttavia, le piastre esposte sotto cappa per un periodo così lungo potrebbero disidratarsi, per cui si consiglia di esporre eventualmente in sequenza due piastre, ciascuna per 2 ore.
Parametro: ufc/4 ore.
- Valutazione *Contact plates* (Piastre per contatto)
Si effettua per il campionamento delle superfici e a tale

scopo sono utilizzate piastre di coltura del diametro di 55 mm che vengono messe a contatto diretto con i siti di campionamento facendo aderire il terreno della piastra alla superficie per alcuni secondi senza compiere alcun movimento lineare o circolare.

Parametro: ufc/piastra.

Per siti di campionamento particolari, poco compatibili con la rilevazione mediante piastre "a contatto", è possibile utilizzare tamponi sterili. La superficie di contatto accessibile deve essere $\sim 25 \text{ cm}^2$, Il tampone imbevuto di soluzione sterile viene strisciato sull'area di campionamento. Il risultato così ottenuto è espresso in cfu/piastra, con limite di accettabilità definito in GMP per le piastre a contatto.

- Valutazione Impronta delle dita del guanto (Piastrre per contatto)

Il test è utilizzato per verificare la pulizia dell'ambiente di lavorazione e può essere anche utilizzato come qualifica del personale.

L'impronta delle 5 dita del guanto su piastra a contatto deve essere applicata per ca. 5-10 secondi, facendo attenzione a non danneggiare la superficie di agar.

TERRENI DI COLTURA UTILIZZATI

Sono utilizzati terreni di coltura semplici e/o arricchiti e/o selettivi per la conta microbiologica totale e per ricerche microbiche specifiche (es.: lieviti e muffe).

Le piastre devono essere incubate nel tempo più breve possibile al fine di garantire che i microrganismi rimangano vitali fino al momento in cui la piastra è trasferita in un ambiente di rilevamento della crescita.

Le piastre possono essere conservate e trasportate in un am-

biente a temperatura controllata 2-10°C per un tempo non superiore a 24 ore.

I terreni di coltura delle piastre devono essere corredati dei certificati del test di promozione della crescita e di idoneità del metodo.

Metodologia dell'Incubazione = 3-5 gg a 20-25° C seguita da un'ulteriore incubazione a 30-35° C per altri 2-3 gg: questo metodo consente di rilevare la maggior parte di batteri e funghi.

NUMERO DI RILEVAZIONI

Per determinare il numero di campioni per il controllo sia della contaminazione dispersa nell'aria che delle superfici, si deve tener conto del volume dell'ambiente, della superficie e delle caratteristiche strutturali del laboratorio.

Si consiglia di effettuare i seguenti controlli:

- campionamento attivo dell'aria: n. di punti come per la conta delle particelle
- campionamento passivo dell'aria: sotto cappa, in attività
- piastre a contatto: da 5 a 10 punti di campionamento.

SITI DEL LABORATORIO DOVE EFFETTUARE LA CONTA MICROBIOLOGICA

La conta microbiologica deve essere effettuata all'interno delle cappe a flusso laminare per la valutazione del rispetto del grado di contaminazione (grado A).

Il campionamento attivo dell'aria deve essere eseguito all'interno della cappa sia *at rest* che *in operation* (magari in attività routinaria simulata).

Per quanto riguarda invece la valutazione del rispetto dei parametri dell'ambiente di fondo (grado D), il responsabile del

laboratorio identifica i punti in cui effettuare la verifica (piani di lavoro, pavimento, superfici verticali, apparecchiature, pass box, carrelli, sedie, bocchette di immissione ed estrazione aria, interfonni, maniglie, porte...) in funzione della struttura del laboratorio stesso, del tipo di strumenti presenti e dell'impatto che possono avere in termini di rischio di contaminazione alcuni passaggi di lavorazione, la presenza di personale o di altro materiale.

Il controllo della biocontaminazione deve essere effettuato anche all'interno degli incubatori.

FREQUENZA DEI CONTROLLI

La frequenza dei controlli dei test microbiologici per la valutazione della biocontaminazione può essere così schematizzata:

1. ARIA

A. Campionamento attivo (es. SAS)

- Cappa a flusso laminare: ogni 6 mesi
- Locale grado D: almeno ogni anno

B. Campionamento passivo (piastre per deposizione)

- Cappa a flusso laminare: *in operation*, durante la lavorazione
- Locale grado D: almeno ogni anno

2. SUPERFICI

- Cappa a flusso laminare:

- *At rest*: ogni 6 mesi
- *In operation*: a termine della processazione
- Locale grado D: almeno ogni anno

Dato che i risultati dei controlli sono disponibili dopo più di cinque giorni e cioè dopo che il transfer degli embrioni in

utero è stato eseguito, non è possibile assicurare che un ciclo di PMA già concluso sia stato eseguito nel rispetto del grado A di contaminazione microbica.

La valutazione quotidiana dello stato di limpidezza e purezza dei terreni di coltura costituisce comunque un valido supporto alla validazione del processo.

Nel caso di contaminazione, il responsabile del laboratorio informerà il responsabile clinico del centro PMA. Questo evento deve essere considerato come "Non Conformità" e quindi come tale deve essere trattato all'interno del Sistema Qualità del centro PMA.

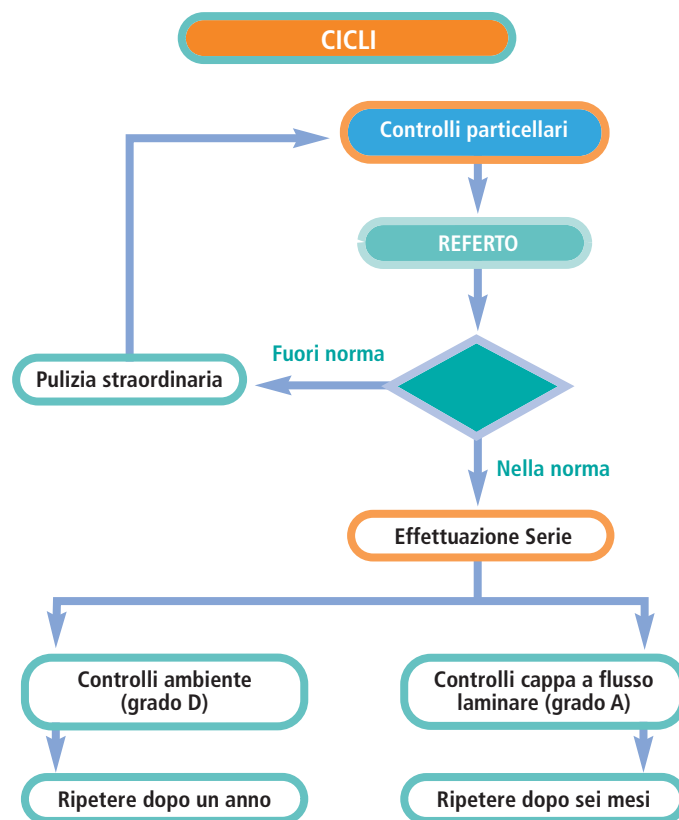
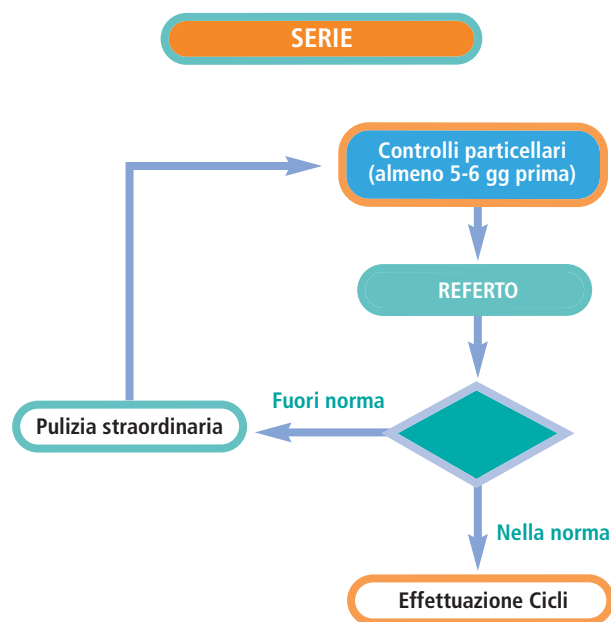
Tutti i controlli microbiologici, compresa l'incubazione delle piastre, possono essere effettuati nel proprio Centro di PMA e letti dal biologo o figura equipollente del Centro stesso.

Nei Centri in cui l'attività viene svolta "in serie", dopo il periodo di chiusura dell'unità di trattamento d'aria e alcuni giorni prima dell'inizio dell'attività si deve provvedere alla riqualifica dell'ambiente, con controlli ambientali sia dei parametri fisici che di quelli microbiologici. L'attività sarà ripresa solo a risultati conformi alle specifiche predefinite.

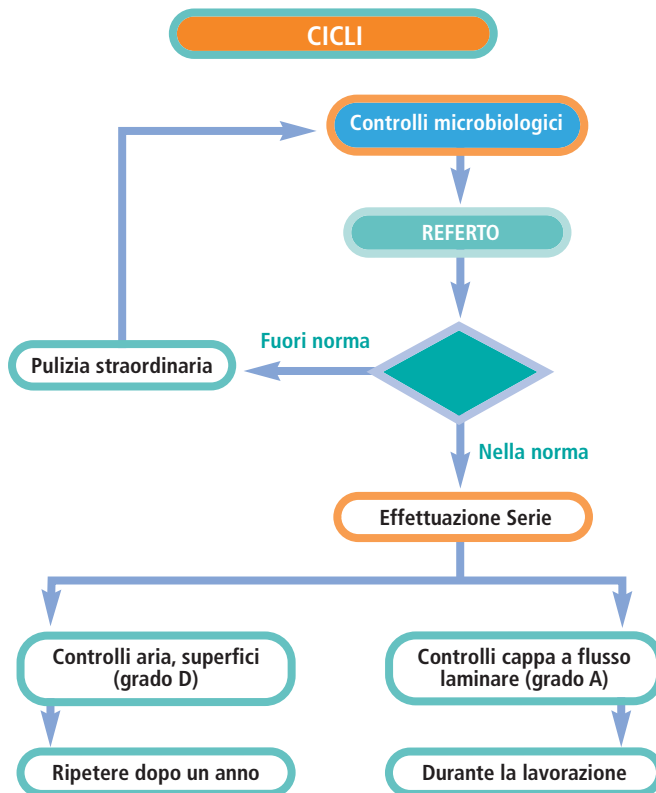
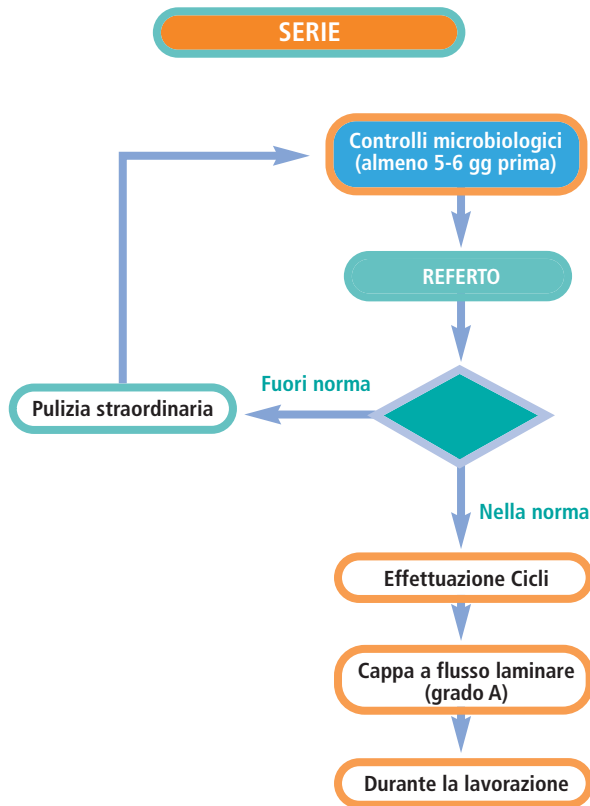
In ogni caso in cui la verifica di grado non risultasse idonea (per la conta particellare e/o per la carica microbica), verrà eseguita una manutenzione straordinaria degli ambienti fino al ripristino delle condizioni richieste, che devono essere documentate.

Qualora le piastre rivelassero ripetutamente la presenza di risultati fuori specifica nelle stesse sedi e/o in seguito alla manutenzione/pulizia straordinaria, è opportuno valutare la tipizzazione dei microrganismi.

CONTROLLI PARTICELLARI



CONTROLLI MICROBIOLOGICI



STRUTTURAZIONE DI UN LABORATORIO DI PMA

La progettazione di un laboratorio di PMA deve prevedere determinate caratteristiche per facilitare il rispetto dei limiti imposti per legge.



Il laboratorio deve essere progettato in maniera tale da facilitare la pulizia e quindi, per esempio, con pareti a superficie liscia e regolare con raccordi con il pavimento arrotondati, prese elettriche da incasso, controsoffitti in materiale non poroso sigillati, lampade complanari, le bocchette di mandata dell'aria a soffitto e le griglie di ripresa a livello del pavimento, con un numero adeguato di ricambi d'aria (10-20) che permettono un flusso adeguato per la pulizia del locale.

Per evitare alte concentrazioni di VOC (*Volatile Organic Compounds*) nell'aria all'interno del laboratorio, bisognerebbe tener conto del tipo di colle e di vernici utilizzate (basse emissioni di VOC).



Per mantenere una qualità dell'aria controllata non devono esserci aperture verso l'esterno (finestre). È auspicabile che nel locale sia ridotta il più possibile la presenza di superfici o di recessi in cui possa accumularsi polvere, così come dovrebbe essere introdotto nel locale solo il materiale di volta in volta necessario per la lavorazione, evitando quanto più possibile il deposito anche di documenti cartacei.

La disposizione della strumentazione deve essere tale da permettere facilmente la pulizia sia degli ambienti che degli strumenti stessi.

Il laboratorio dovrebbe essere ubicato in contiguità con la sala adibita al prelievo degli ovociti per consentire un passaggio diretto delle provette contenenti il liquido follicolare in laboratorio (Fig. 2).

L'aerazione deve essere strutturata in modo che, all'interno del laboratorio, la pressione dell'aria sia superiore a quella dei locali adiacenti meno puliti, al fine di impedire l'infiltrazione di aria esterna dai locali adiacenti a minor pulizia.

La differenza minima di pressione tra due locali collegati deve essere almeno di 10 Pa.

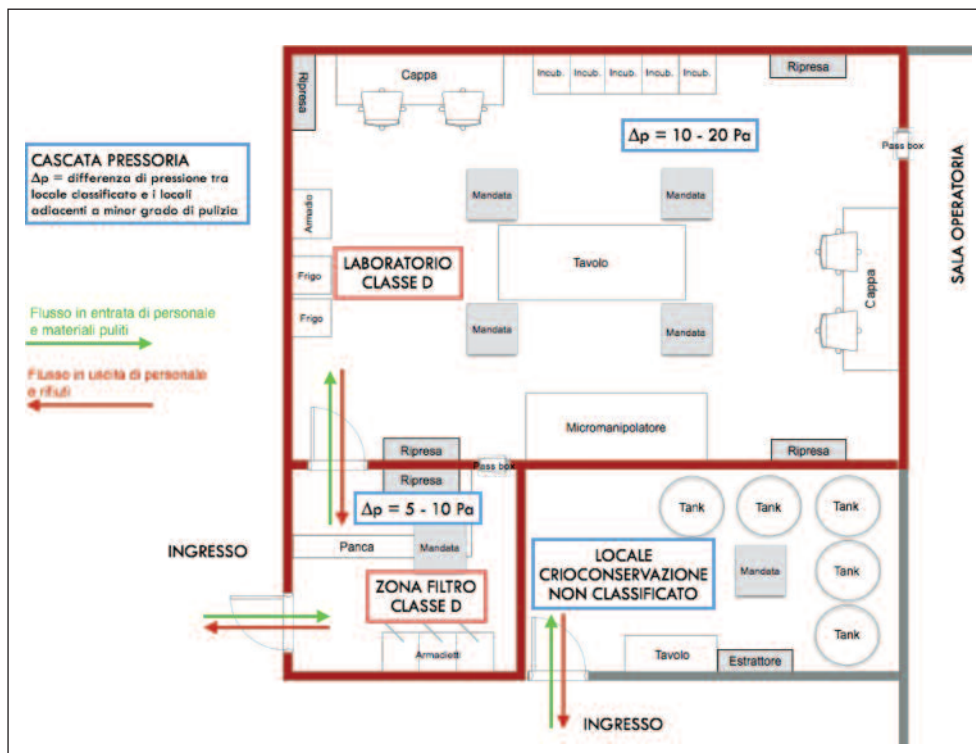


Figura 2
Esempio di Laboratorio di PMA.

L'aria deve essere immessa in laboratorio dopo che è stata sottoposta a filtrazione con filtri assoluti terminali ad alta efficienza (HEPA: *High Efficiency Particulate Air* con un filtraggio aria del 99.97% e che trattiene particelle con diametro > 0.3µ). Per ridurre la percentuale di VOC, sia nell'aria del laboratorio che all'interno degli incubatori, è possibile utilizzare un ulteriore sistema di filtraggio a base di carbonio attivato e permanganato di potassio. Altrettanto importante è il ricambio dell'aria. Facendo riferimento alle normative EN ISO 14644-4, il numero di ricambi di aria/ora nella classe ISO 8 (che, come detto, corrisponde al grado D delle GMP) deve essere ≥ 10 . Per quanto riguarda i valori di temperatura ambiente, questi devono essere compresi tra 18° C e 24° C, mentre l'umidità deve essere compresa tra il 40% ed il 60%.

REFERENZE

- Decreto legislativo 6 novembre 2007 n. 191 (GURI n. 261 del 9 novembre 2007).
- Decreto legislativo 25 gennaio 2010 n. 16 (GURI n. 40 del 18 febbraio 2010).
- EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008).
- UNI EN ISO 14644 Camere bianche ed ambiente associato controllato
- UNI EN ISO 14698 Camere bianche ed ambienti associati controllati. Controllo della biocontaminazione.
- Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009).
- EDQM Guide ed. 2 2015.