

Cap 1
**Requisiti ambientali e controlli di qualità
ambientale**

Aldo Volpes

Centro Andros s.r.l.

Unità di Medicina della Riproduzione, Palermo

I requisiti minimi, per quanto riguarda la qualità dell'aria, che un laboratorio di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) deve possedere sono descritti nell'*allegato V*, del decreto legislativo 25 gennaio 2010 n. 16.

Il paragrafo D, punto 3 recita:

"...per la qualità dell'aria è previsto quale requisito un numero di particelle e un numero di colonie microbiche equivalente a quelli di grado A di cui all'allegato 1 della guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (Good Manufacturing Practice: GMP),con un ambiente di fondo adeguato alla lavorazione dei tessuti/cellule interessati ma almeno equivalente a GMP di grado D in termini di particelle e di colonie microbiche."

Il paragrafo D, punto 4 recita:

"Condizioni ambientali meno rigorose di quelle sopraindicate possono essere accettabili qualora:b) sia dimostrato che il contatto con un ambiente di grado A ha effetti nocivi sulle proprietà richieste per i tessuti o cellule di cui si tratta, oppure c) sia dimostrato che le modalità e il percorso di applicazione di tessuti o cellule al ricevente comportano un rischio di trasmettere al ricevente infezioni batteriche o fungine, notevolmente inferiore rispetto al trapianto di cellule e tessuti, oppure d) non sia tecnicamente possibile eseguire il procedimento richiesto in un ambiente di grado A (ad esempio perchè nella zona di lavorazione occorrono attrezzature specifiche non del tutto compatibili con il grado A).

Una classificazione della qualità dell'aria deve essere fatta inizialmente, dopo l'installazione e la pulizia degli ambienti e poi monitorata periodicamente, mediante:

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

CONTA PARTICELLARE

Per quanto concerne la conta particellare, vengono di seguito riportati i limiti descritti nelle EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008).

	Maximum permitted number of particles per m ³ equal to or greater than the tabulated size			
	At rest		In operation	
Grade	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	Not defined	Not defined

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” dovrebbe 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”, 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 rispecchiate 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 flussi laminari (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, norma che descrive nel dettaglio anche le modalità di esecuzione di tali controlli.

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 richiedere un certificato in cui sono riportati i parametri GMP.

Strumenti per la conta particellare

Lo strumento per la conta particellare utilizzato per le rilevazioni deve essere corredato di un certificato di taratura rilasciato da una struttura autorizzata e accreditata (es.: SIT), copia del quale deve essere rilasciato insieme ai risultati del controllo.

Numero di rilevazioni

Il numero delle rilevazioni deve essere di almeno due punti; per ambienti con una superficie superiore ai 4 m² il numero dei punti da campionare deve essere calcolato secondo la seguente formula (vedi norme ISO 14644-1):

$$N_L = \sqrt{A}$$

dove N_L è il numero minimo di rilevazioni

A è l'area del laboratorio espressa in metri quadrati

Volume di aria da campionare

Per il grado A, la rilevazione per ogni punto deve essere effettuata su almeno un m³ 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 (ISO14644-1 B 4.2.2).

Posizionamento dello strumento per la conta particellare

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 solo all'interno delle stesse.

Per quanto riguarda invece le rilevazioni delle particelle che devono essere effettuate per il rispetto dell'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, etc.).

Frequenza dei controlli

E' consigliabile una frequenza minima annuale. In caso di eventi particolari (contaminazioni, installazione di nuove apparecchiature) sarà cura del responsabile del laboratorio attivare i controlli senza attendere la scadenza annuale.

La frequenza deve comunque essere stabilita anche sulla base del volume di attività svolta nel laboratorio. In caso ci si appresti a fare la rilevazione in un nuovo laboratorio o per la prima volta o in caso di presenza in laboratorio di nuovo personale, sarebbe opportuno effettuare rilevazioni ravvicinate nel tempo, in presenza di processazioni analoghe e uguale composizione dello staff di laboratorio, per poi decidere una tempistica (semestrale o annuale) sulla base dei risultati ottenuti. Al fine di una significatività statistica, dovrebbero essere campionati per questa fase iniziale di convalida almeno tre punti per ogni controllo.

CONTA MICROBIOLOGICA

Vengono di seguito riportati i limiti di contaminazione microbiologica raccomandati nelle EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008).

	Recommended limits for microbial contamination (a)			
Grade	Air sample cfu/m ³	Settle plates (diameter 90 mm) Cfu/4 hours (b)	Contact plates (diameters 55 mm) Cfu/plate	Glove print 5 fingers Cfu/glove
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

(a) These are average values

(b) Individual settle plates may be exposed for less than 4 hours

Metodi di campionamento

Possono essere utilizzati vari tipi di campionamento:

✓ Valutazione "Air sample"

Si effettua tramite campionamenti "attivi" aerei e a tale scopo sono utilizzati particolari aspiratori che permettono all'aria di passare attraverso piastre di coltura montate sull'apparecchio (Campionatore SAS). Parametro: CFU/m³

✓ Valutazione "Settle plates"

Si effettua tramite campionamenti "passivi" aerei e a tale scopo sono utilizzate piastre di coltura del diametro di 90 mm che vengono mantenute aperte 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 non

consentendo quindi un risultato valido; per tale motivo si consiglia di esporre eventualmente in sequenza due piastre, ciascuna per 2 ore.

Parametro: Cfu/4 hours

✓ Valutazione "Contact plates"

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. Parametro: Cfu/plate

Per siti di campionamento particolari, poco compatibili con la rilevazione mediante piastre "a contatto", è possibile utilizzare tamponi sterili. Il campione è poi seminato successivamente sulle piastre di coltura.

Terreni di coltura utilizzati

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

Numero di rilevazioni

Per determinare il numero di campioni per il controllo della contaminazione dispersa nell'aria a riposo si deve tener conto del volume dell'ambiente:

$N. \text{ campioni} = 3\sqrt{VA}$ (dove A = volume del locale espresso in m^3)

Per determinare il numero di campioni per il controllo della contaminazione delle superfici si deve tener conto dell'area del locale o della stazione di lavoro espresso in m^2 e a questo valore è stata applicata la formula:

$N. \text{ campioni} = 2\sqrt{VA} \times 2$ (dove A = superficie dell'area espressa in m^2).

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).

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 le verifiche, 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. La conta microbiologica deve essere effettuata comunque all'interno degli incubatori.

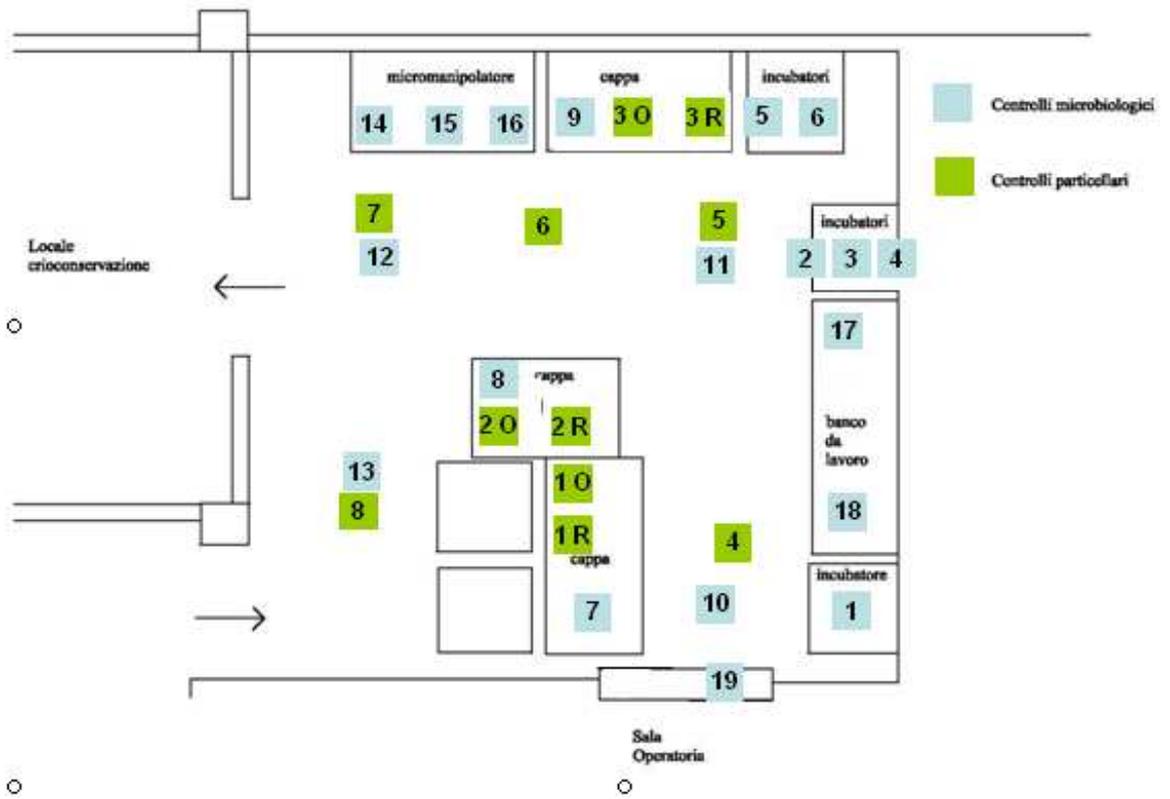
Frequenza dei controlli

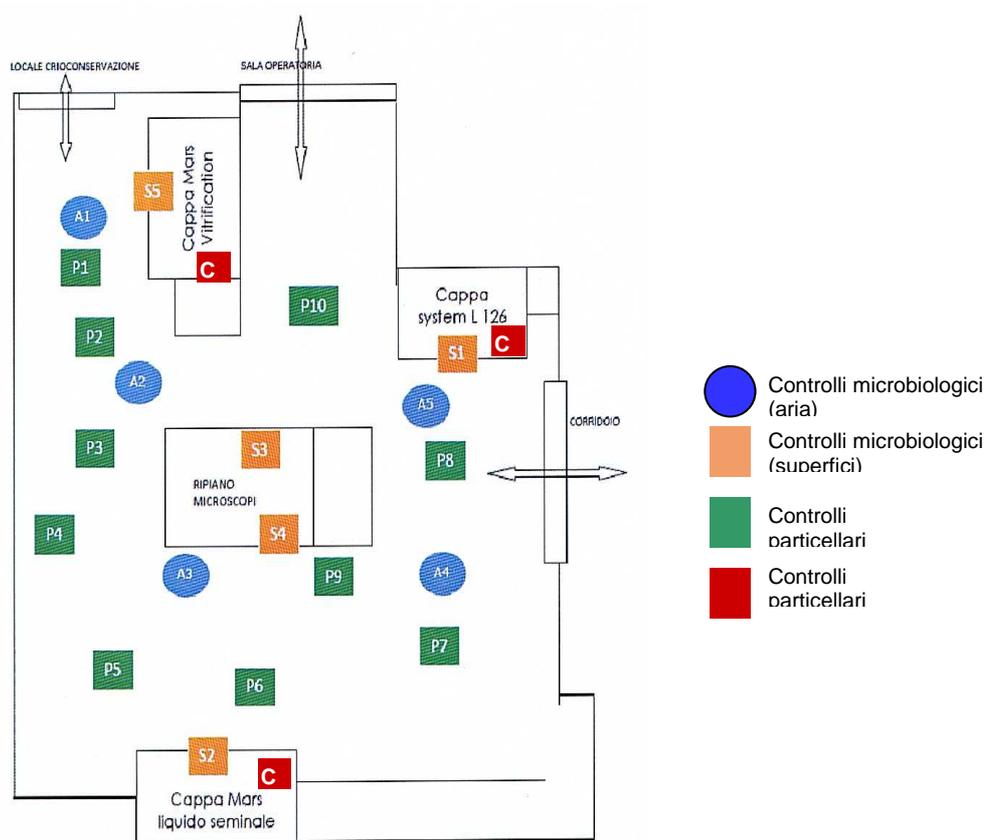
E' consigliabile una frequenza semestrale. In caso di eventi particolari (contaminazioni, installazione di nuove apparecchiature, nuovo personale) sarà cura del responsabile del laboratorio attivare i controlli senza attendere la scadenza semestrale.

La frequenza deve comunque essere stabilita anche sulla base del volume di attività svolta nel laboratorio. In caso ci si appresti a fare la rilevazione in un nuovo laboratorio o per la prima volta, sarebbe opportuno effettuare rilevazioni ravvicinate nel tempo, in presenza di processazioni analoghe e uguale composizione dello staff di laboratorio, per poi decidere una tempistica sulla base dei risultati ottenuti. Al fine di una significatività statistica, dovrebbero essere campionati per questa fase iniziale di convalida almeno tre punti per ogni controllo.

Se 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. Gli eventuali ceppi microbici rilevati sono identificati.

Vengono di seguito riportate, come esempio, le piantine di due laboratori di PMA con le specifiche dei punti di campionatura per il controllo particellare e microbiologico.





Strutturazione di un laboratorio di PMA

La strutturazione di un nuovo laboratorio di PMA dovrebbe prevedere determinate caratteristiche per facilitare il rispetto dei limiti imposti per legge.

In fase realizzativa, il laboratorio di PMA dovrebbe 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 sigillati, lampade complanari.

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

Per mantenere una qualità dell'aria controllata non devono esserci aperture verso l'esterno (finestre). E' 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 ai prelievi degli ovociti per consentire un passaggio diretto delle provette contenenti il liquido follicolare in laboratorio.

L'aerazione dovrebbe essere strutturata in modo che, all'interno del laboratorio, la pressione dell'aria sia superiore a quella dei locali adiacenti meno puliti, con una differenza di almeno 10 pascal, al fine di creare un flusso di aria a pressione positiva dall'interno verso l'esterno.

L'aria dovrebbe essere immessa in laboratorio dopo che è stata sottoposta ad un filtraggio con filtri assoluti ad alta efficienza (HEPA: High Efficiency Particulate Air con un filtraggio aria del 99.97% e che trattiene particelle con diametro $>0.3\mu$; oppure ULP: Ultra-Low Penetration Air con un filtraggio aria del 99.999% e che trattiene particelle con diametro $>0.12\mu$). 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) dovrebbe essere ≥ 10 .

Per quanto riguarda i valori di temperatura ambiente, questi dovrebbero essere compresi tra 20°C e 24°C, mentre l'umidità dovrebbe essere compresa tra il 40% ed il 60%.

Bibliografia

- EU Guidelines to Good Manufacturing Practice (GMP) Annex 1 (update 2008)
- UNI EN ISO 14644 Cleanrooms and associated controlled environments
- UNI EN ISO 14698 Cleanrooms and associated environments- Biocontamination control
- Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009)