

Ambienti a contaminazione biologica controllata in laboratorio

Paolo A. Parrello

Lavorare in condizioni asettiche in molti laboratori è un requisito imprescindibile. Spesso i banchi sterili o le cabine di sicurezza microbiologica non sono sufficienti sia per il limitato spazio di lavoro a disposizione, sia per la mancanza di controllo sull'ambiente per prevenire eventuali contaminazione del materiale sterile. In tali contesti è difficile garantire il livello richiesto di pulizia ambientale se non ricorrendo a soluzioni impiantistiche complesse e non sempre facilmente ed economicamente realizzabili. Qualche suggerimento per i "piccoli" laboratori.

La tecnologia del controllo della contaminazione ambientale è ormai matura e ben collaudata. Industrie farmaceutiche, elettroniche, opto-elettroniche, alimentari, nonché le industrie biomedicali operano i processi critici per il prodotto in *clean-rooms*, o camere bianche, nelle quali la contaminazione particellare e microbiologica dell'aria e delle superfici è mantenuta sotto stretto controllo secondo metodi di campionamento ed entro limiti ben definiti da norme e linee guida internazionali (EN ISO 14698, EN ISO 14644, Eu-GMP, USP 797, per esempio).

Tali ambienti possono avere anche un livello di complessità tecnologica molto elevato, comprendendo oltre ai sistemi di ventilazione, condizionamento e filtrazione dell'aria, sistemi più o meno complicati di monitoraggio in continuo dei parametri ambientali compresa la contaminazione particellare e biologica.

Considerando che la maggior parte dei microrganismi patogeni ha un diametro superiore ai 0,5 μm , i filtri HEPA (*high efficiency particulate air*) hanno trovato ampia applicazione in campo biologico e medico per "decontaminare" l'aria senza utilizzare sostanze chimiche o radiazioni eccitanti o ionizzanti dannose per la salute dell'operatore o per il prodotto biologico manipolato.

I filtri assoluti sono classificati dalla norma tecnica di riferimento **EN 1822** secondo la loro efficienza di filtrazione in filtri HEPA e ULPA. Nel campo di nostro interesse, il laboratorio, sono ampiamente utilizzati i filtri **HEPA H14** (Efficienza iniziale minima EI 99,995%) e i filtri **ULPA U15** (*Ultra Low Penetration Air*, Efficienza iniziale minima EI 99,9995%).

La possibilità di rimuovere le particelle presenti nell'aria compresi batteri e indirettamente virus (sempre veicolati da aerosol o da cellule), ha reso possibile la realizzazione di **banchi sterili a flusso laminare verticale o orizzontale**, di **cabine contro rischi biologici** e di **ambienti a contaminazione controllata** come le sale operatorie, i laboratori di sicurezza microbiologica, le unità farmaci antiblastici (UFA), le camere sterili di reparti di isolamento pazienti immunodepressi, grandi ustionati o infettivi, banche di tessuti (cornee, osso, ecc.) e laboratori di produzione cellulare (*cell factories*), oltre tutte le applicazioni industriali in campo farmaceutico e alimentare.

La norma **EN ISO 14644-1** classifica il livello di pulizia dell'aria degli ambienti a contaminazione controllata in 9 classi (da 1 a 9) e definisce le quantità massime di particelle con differenti diametri (da 0,1 a 5,0 μm) ammesse per metro cubo di aria campionata. La classe di riferimento per le **applicazioni biologiche** è la **classe ISO 5** (ex classe 100, sec. FS209) che per le particelle con diametro uguale o maggiore di 0,5 μm ammette al massimo 3.520 unità per metro cubo di aria campionata. La classe ISO 5 è il riferimento per tutte le aree in cui svolgere attività asettiche, quindi anche per la zona di lavoro delle cappe biologiche (vedi scheda tecnica Novaria Services n. 1, per maggiori informazioni).

E' importante ricordare che i filtri assoluti HEPA e ULPA agendo prevalentemente come un "setaccio meccanico" non hanno alcun effetto sui contaminanti chimici presenti nell'aria sotto forma di vapori o gas, per i quali occorre adottare specifici filtri a carbone attivo o setacci molecolari secondo la tipologia di inquinante.

Da un punto di vista microbiologico è però necessario specificare quante delle particelle ammesse per ogni classe di pulizia ambientale dalla norma ISO possono essere vitali, ovvero unità formanti colonia (CFU, *Colony forming units*). Per ottenere questa indicazione si fa riferimento alle aree definite dall'allegato 1 della linea guida europea di buona fabbricazione farmaceutica **EU-GMP** (*Good Manufacturing Practice*) per la produzione di farmaci e altri prodotti sterili.

**Comparazione semplificata tra le classi di pulizia ambientale Eu-GMP e ISO 14644
per particelle aerodisperse da 0,5 µm**

GMP	at rest	classe ISO	in operation	Classe ISO
Grade A	3500	5 (4,8)*	3 500	5 (4,8)*
Grade B	3500	5	35 000	7
Grade C	350000	7	3 500 000	8
Grade D	3 500 000	8	ND	>8

*) Il Grade A delle GMP prevede un massimo di 20 particelle da 5 µm anziché 29 come previsto dalla ISO 14644

Secondo l'Annex 1 delle Eu-GMP per quanto concerne l'asetticità del processo, la quantità massima ammissibile di unità formanti colonia (CFU) non deve superare i seguenti limiti:

Limiti raccomandati per la contaminazione microbiologica

GMP	CAMPIONAMENTO ARIA CFU/mc	PETRI 90 MM CFU/ 4 ORE PER DEPOSITO	PETRI 55 MM PER PRODOTTO CFU/ PIASTRA	IMPRONTA GUANTI 5 DITA CFU/ GUANTO
Grade A	< 1	< 1	< 1	< 1
Grade B	10	5	5	5
Grade C	100	50	25	-
Grade D	200	100	50	-

Questa indicazione è molto importante per tutti coloro che operano con "materiale biologico" destinato a trapianti o terapie su pazienti (*cell factories*, banche di organi e tessuti, farmacia ospedaliera per preparazioni sterili iniettabili o di chemioterapici, ecc.). L'attività che comporta l'esposizione del materiale sterile all'aria deve avvenire in Grade A, e la zona circostante deve essere in Grade B. I livelli Grade C e D sono rispettivamente per le aree di accesso e di servizio alle aree B e A. La norma EN ISO 14698-1 definisce principi generali e metodi per il controllo della biocontaminazione negli ambienti classificati ISO.

Nella maggioranza dei laboratori biologici però non è tecnicamente o economicamente possibile realizzare un laboratorio a contaminazione controllata e quindi occorre adottare soluzioni più semplici ed accessibili per ridurre il più possibile il rischio di biocontaminazione del materiale trattato. Per esempio in un locale dedicato alla manipolazione e conservazione di linee cellulari particolarmente delicate, risulterà opportuno adottare alcune semplici precauzioni come la disinfezione periodica e l'adozione di rigorose procedure operative e di accesso al locale "clean".

Un sistema economico per migliorare la situazione è quello di procedere alla disinfezione preventiva dei locali laboratorio secondo un calendario predefinito, senza attendere il manifestarsi di una contaminazione del materiale difficile poi da gestire e, soprattutto, dopo aver subito il danno. Sono oggi disponibili sul mercato sistemi di disinfezione a Perossido di Idrogeno facili da usare ed economici. Per chi invece preferisce delegare questa attività, sono sempre più diffuse le società di assistenza tecnica che offrono il servizio di disinfezione in abbonamento. Il trattamento ripetuto con una certa frequenza e regolarità permette non solo di abbattere la carica microbica presente nel locale, ma anche di ritardarne la crescita.

Eseguita la disinfezione periodica dei locali, occorre mantenere basso il livello di biocontaminazione del laboratorio. Un aiuto può arrivare dalle cappe biologiche e dalle cabine biohazard se mantenute costantemente accese giorno e notte, perché filtrando in continuo l'aria del locale riducono la

contaminazione particellare presente. Non si deve temere una riduzione della durata dei filtri assoluti dato che in tali circostanze lavorano sul medesimo volume di aria.

Oppure, sempre che non si utilizzino agenti biologici classificati, è possibile isolare in parte o tutto il locale in cui svolgere le attività più critiche per la sicurezza del prodotto. Sono in commercio sistemi modulari che permettono di isolare una parte del locale e di mantenerlo in pressione positiva mediante unità che incorporano filtro HEPA e elettroventilatore. Le pareti sono realizzate con film plastici o con cortine in PVC e la struttura è molto leggera e in grado di ospitare la cappa biologica e l'incubatore a CO₂. Una alternativa è quella di installare nella parete tra corridoio e laboratorio un modulo soffiante/filtrante: immettendo aria filtrata HEPA nel locale lo manterrà ad un livello di pressione superiore rispetto al corridoio impedendo così l'ingresso di aria sporca. L'aria immessa verrà espulsa dal locale tramite un griglia posta sulla porta. Occorre però verificare che il flusso d'aria generato dal modulo soffiante/filtrante e il gradiente di pressione non disturbino il corretto funzionamento delle cappe biologiche presenti nel locale.

Ma sono soprattutto i piccoli gesti quotidiani che possono migliorare la situazione: mantenere le porte e le finestre il più possibile chiuse, evitare l'ingresso e l'uscita dal locale di persone estranee prive di indumenti adatti e puliti. Gli indumenti indossati sono infatti una fonte inesauribile di contaminazione, così come quella prodotta dal corpo umano. Per questo motivo occorre adottare comportamenti adeguati alla delicata attività svolta, come indossare camici allacciati posteriormente e dedicati al solo utilizzo in laboratorio, guanti lunghi che sovrastino il polsino del camice, ed evitare di operare con parti del corpo scoperte all'interno delle cappe biologiche (es. polso ed avambraccio, magari indossando orologio o braccialetto). Il locale va mantenuto pulito e con il minimo di oggetti all'interno, sia come arredi sia come materiali di consumo, evitando di introdurre e aprire imballaggi all'interno del laboratorio e disinfettando la superficie esterna degli oggetti introdotti nella zona sterile delle cappe.

La formazione del personale rappresenta un elemento di criticità, perché spesso è fatta in maniera frettolosa e superficiale dando per scontato la conoscenza dei principi base per l'utilizzo in sicurezza, per sé e per gli altri oltre che per il materiale, delle cappe biologiche. Sono soprattutto le piccole attenzioni quotidiane, i singoli gesti, che possono aiutare a ridurre il rischio di contaminazione del prezioso materiale biologico oggetto del nostro lavoro.-

Novaria Services ringrazia StudioPAP per l'autorizzazione alla pubblicazione del presente articolo tratto dal sito www.sicurezzaalaboratorio.it

NOVARIA SERVICES srl

Validazione impianti – Verifiche periodiche– Assistenza Tecnica – Consulenza
Impianti e sistemi per il controllo della contaminazione dell'aria

Via Pitagora, 1 – 27010 GIUSSAGO (PV)
Tel. 0382939747 – FAX 0382939182

www.novariaservices.it

info@novariaservices.it