

# **VERIFICA E MANUTENZIONE D.P.C.**

## **CAPPE BIOLOGICHE**

## **CABINE DI SICUREZZA MICROBIOLOGICA (BIOHAZARD)**

**Brochure informativa**

**INTRODUZIONE**

Le cappe di sicurezza biologica o microbiologica, spesso denominate cappe o cabine biohazard, sono dispositivi primari di protezione collettiva presenti in ogni laboratorio biologico in quanto servono a proteggere l'operatore e l'ambiente di lavoro dal rischio di esposizione agli aerosol di agenti patogeni. Alcune versioni sono inoltre utilizzate per garantire sicurezza all'operatore e sterilità al prodotto manipolato, come nel caso delle colture cellulari o della preparazione di farmaci chemioterapici.

Il fulcro dell'attività protettiva della cappa è il filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air filter) composto da foglietti filtranti di microfibre assemblati in più strati, separati da setti in alluminio. In base al grado di protezione della cappa possono essere presenti uno o più filtri HEPA a garantire la filtrazione dell'aria in entrate e/o in uscita.

Le cappe a flusso laminare sono suddivise in tre categorie che corrispondono a livelli diversi di sicurezza:

**Classe I:**

La protezione è resa possibile grazie al flusso dell'aria diretto dall'esterno all'interno della cappa attraverso un'apertura frontale. La protezione ambientale viene realizzata tramite un filtro HEPA nel sistema di scarico. Questa tipologia di cappa è in grado di proteggere esclusivamente l'operatore dalla contaminazione del materiale manipolato, mentre non sono previste misure di protezione per il prodotto. Vengono utilizzate per la manipolazione di agenti biologici a basso e medio rischio;

**Classe II:**

Tra le cappe a flusso laminare, quelle di Classe II sono sicuramente quelle a maggiore diffusione. La filosofia di progettazione di questi dispositivi è rivolta alla protezione dell'operatore, alla protezione del campione (visto che l'aria in ingresso in cabina viene preventivamente filtrata da un sistema di filtri HEPA) oltre che a quella dell'ambiente.

Questa classe di cappe è divisa in sottoclassi in funzione del grado di ricircolo dell'aria nel vano interno, in particolare le cappe di classe IIA garantiscono un ricircolo interno dell'aria prefiltrata pari al 70% (solo il 30% dell'aria viene costantemente rinnovato) e sono in grado di fornire la massima protezione dei campioni manipolati.

**Classe III:**

Sono cappe a chiusura totale ed ermetica, funzionano a pressione negativa e le manipolazioni all'interno della cappa avvengono tramite dei guanti inseriti nella struttura stessa della cappa da qui la denominazione di "glove box".

Hanno un filtro HEPA sull'aria in ingresso ed un doppio filtro HEPA sull'aria in uscita. Tale configurazione garantisce una protezione totale dell'operatore e dell'ambiente. Tali dispositivi sono adatti alle manipolazioni ad alto rischio biologico e sono utilizzati anche in caso di manipolazioni di agenti cancerogeni e antitumorali.

**RIFERIMENTI LEGISLATIVI E NORMATIVI****art. 71 D.Lgs. 81 e s.m.i.**

*1. Il datore di lavoro mette a disposizione dei lavoratori attrezzature [omissis], idonee ai fini della salute e sicurezza e adeguate al lavoro da svolgere o adattate a tali scopi che devono essere utilizzate conformemente alle disposizioni legislative di recepimento delle direttive comunitarie.*

**4. Il datore di lavoro prende le misure necessarie affinché:**

*a) le attrezzature di lavoro siano:*

*1) installate ed utilizzate in conformità alle istruzioni d'uso;*

*2) oggetto di idonea manutenzione al fine di garantire nel tempo la permanenza dei requisiti di sicurezza [omissis] e siano corredate, ove necessario, da apposite istruzioni d'uso e libretto di manutenzione;*

*[omissis]*

Le cappe chimiche sono dei dispositivi di protezione collettiva e importanza fondamentale è il richiamo **all'art. 64 comma 1-e del D.Lgs. 81 e s.m.i.** che cita: "gli impianti e i dispositivi di sicurezza, destinati alla prevenzione o all'eliminazione dei pericoli, vengano sottoposti a regolare manutenzione e al controllo del loro funzionamento".

La stessa azione di controllo e prevenzione è ancora richiamata con riferimento specifico al Titolo IX – Sostanze pericolose del medesimo D.Lgs.

Le cabine di sicurezza biologica devono essere progettate secondo requisiti specifici regolamentati da standard internazionali: DIN 12950 (Germania); BS 5726 (UK); AFNOR (Francia); NSF 49 (USA). A livello europeo la **UNI EN 12469** è la norma che definisce e unifica gli standard prestazionali di riferimento per le cabine di sicurezza biologica.

Nei paragrafi seguenti vengono individuati i criteri di verifica necessari al mantenimento dei requisiti prestazionali e di sicurezza così come disposti dalla norma tecnica UNI EN 12469.

**VERIFICHE PRESTAZIONALI E DI SICUREZZA PREVISTE PER LE CABINE DI SICUREZZA MICROBIOLOGICA**

Il primo collaudo e le verifiche periodiche di una cappa biologica devono essere effettuati da tecnici specializzati.

Le verifiche in oggetto hanno lo scopo di certificare la corretta installazione della cappa (primo collaudo), gli effetti dei flussi d'aria del laboratorio e l'efficienza del sistema di contenimento ed estrazione dell'aria ecc..

I test di collaudo previsti per le cappe di nuova installazione, da eseguirsi c/o il cliente e certificati secondo normativa vigente, si suddividono in due macroaree: Ispezioni e Prove on Site.

**1) Ispezioni:**

- A. ispezione visiva delle parti costituenti (obiettivi, caratteristiche costruttive e valori minimi per le prestazioni);
- B. ispezione visiva dell'assemblaggio effettuato e dell'integrità di tutte le parti dopo l'installazione;
- C. ispezione della documentazione fornita dal costruttore ed eventuali test separati per propositi specifici.

**2) Prove on site:**

- A. Air Room Velocity test
- B. Smoke test
- C. Verifica del flusso in ingresso (Inflow)
- D. Verifica del flusso laminare verticale (Downflow)
- E. Verifica della classe di pulizia ambientale
- F. Verifica dell'efficienza dei dispositivi filtranti (Leak e integrity test)
- G. Valutazione dell'efficienza di contenimento
- H. Livello di pressione sonora
- I. Illuminamento
- J. Verifica della deriva termica
- K. Prove microbiologiche

**ISPEZIONI – rif 1) A-B-C**

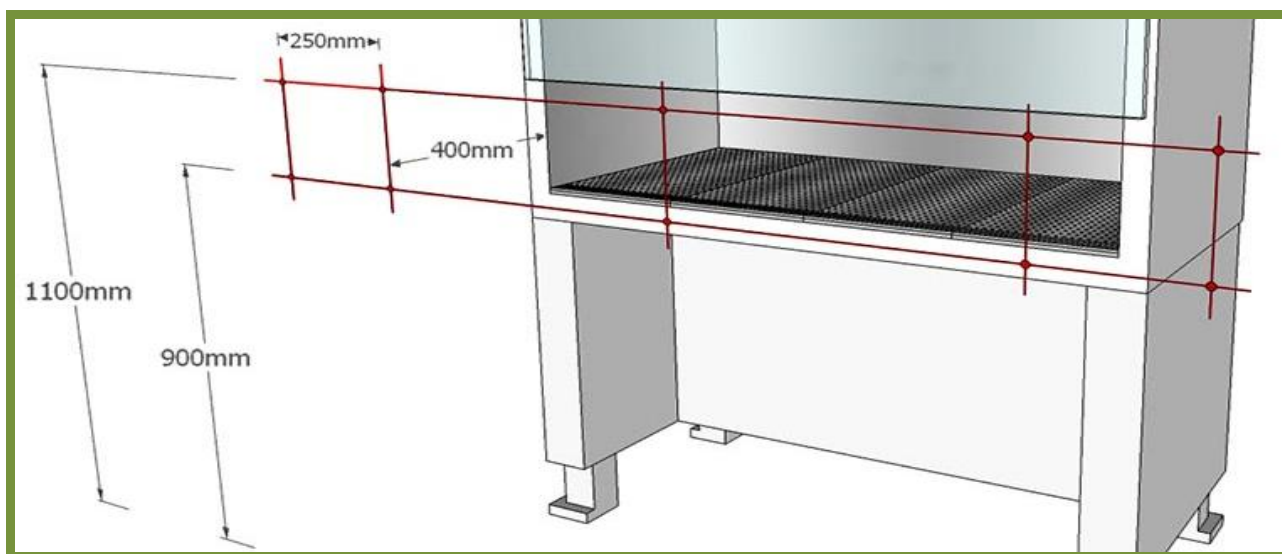
A seguire un elenco esaustivo dei controlli preliminari di routine sui Dispositivi di Protezione Collettiva.

- ispezione visiva delle parti costituenti
- ispezione visiva dell'assemblaggio effettuato e dell'integrità delle componenti
- controllo del regolare scorrimento del vetro frontale e del dispositivo di arresto (ove applicabile)
- controllo della presenza ed efficienza dei distanziatori salvadita
- verifica della funzionalità delle prese elettriche
- verifica della funzionalità prese fluidi/gas
- verifica della funzionalità del neon UV
- verifica dello stato della carrucola e del cavo del saliscendi (ove applicabile)
- verifica della funzionalità di tutti gli allarmi visivi/sonori
- verifica della documentazione relativa agli ultimi controlli eseguiti

**PROVE ON SITE: AIR ROOM VELOCITY TEST – rif. 2) A**

Verifica integrativa non espressamente prescritta dalla UNI EN 12469 per le cabine di sicurezza biologica. Eseguita come test supplementare per valutare la presenza di eventuali correnti tangenti che, scorrendo nelle immediate vicinanze della cappa, potrebbero influenzare negativamente la barriera di protezione operatore (UNI EN ISO 14175) .

Test eseguito con sonda anemometrica omnidirezionale per la determinazione del vettore di velocità massimo del flusso turbolento esterno al DPC. I rilievi vengono eseguiti su due direttrici orizzontali poste rispettivamente a a 900 e 1100(\*) mm dal pavimento. Il piano di misurazione individuato dalle due quote di riferimento dovrà essere disposto ad una distanza di circa 400 mm dal fronte della cappa.



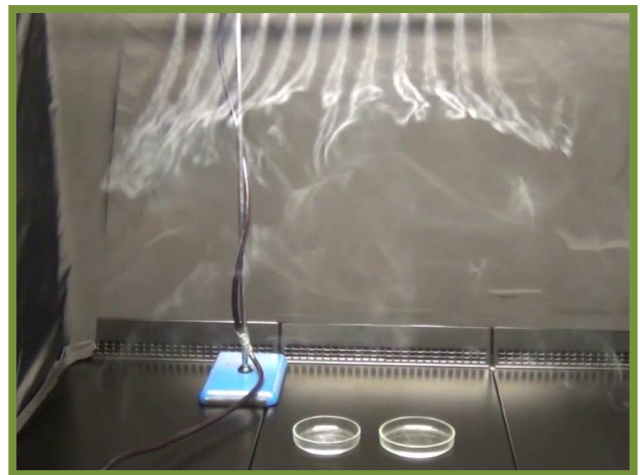
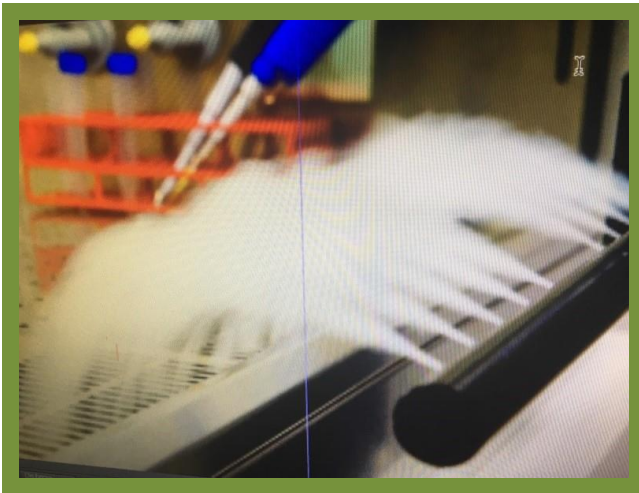
Per ciascuno dei due livelli vengono eseguite cinque misurazioni, della durata di 1 minuto ciascuna, distribuite come di seguito specificato: 2 misurazioni in corrispondenza delle pareti laterali della cappa, 1 in corrispondenza dell'asse centrale del dispositivo e le altre 2 ad una distanza di circa 250 mm (a destra e a sinistra) dalle pareti laterali della cappa.

L'assenza di turbolenze nell'area frontale del dispositivo viene certificata nel caso in cui ciascuno dei 10 valori rilevati su base minuto risulti inferiore a 0,2 m/s .

**PROVE ON SITE: SMOKE TEST – rif. 2) B**

Lo smoke test sulle cabine di sicurezza microbiologica verifica il corretto flusso del tracciante nella zona esterna del DPC lungo tutto il perimetro dell'apertura frontale per valutare l'efficienza di aspirazione del dispositivo (Inflow).

Una ulteriore prova viene eseguita all'interno del dispositivo con la finalità di visualizzare la laminarità del flusso incidente sulla superficie del piano di lavoro (Downflow).



L'analisi visiva dell'andamento del tracciante sarà utile ad individuare possibili disturbi alla barriera frontale in grado di pregiudicare il corretto funzionamento del sistema di aspirazione o eventuali disturbi al flusso laminare verticale previsto all'interno della cabina.

Il test viene eseguito con un generatore di fumo o mediante fialette fumogene in grado di produrre una soluzione acquosa atossica a base di glicerina la cui dinamica di distribuzione fornirà informazioni in merito a direzione e intensità dei flussi in corrispondenza dell'apertura frontale della cappa chimica.

**PROVE ON SITE: VERIFICA DEL FLUSSO IN INGRESSO (INFLOW) – rif. 2) C**

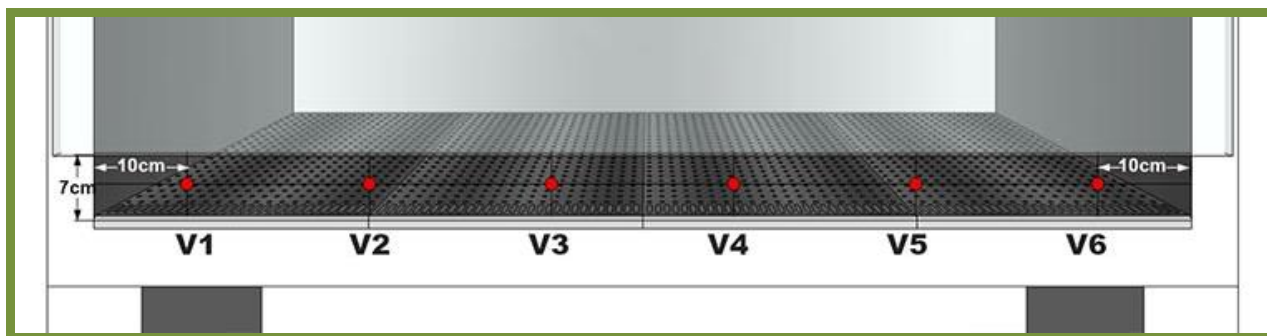
Verifica di tenuta della barriera frontale del DPC mediante misurazione e calcolo dei valori di velocità dell'aria in ingresso.

Il test può essere eseguito mediante "metodo DIRETTO" (cfr. NSF/ANSI 49) o "metodo INDIRETTO" (cfr. UNI EN 12469 - NSF/ANSI 49).

Il metodo di misura "DIRETTO" prevede il rilievo delle velocità in ingresso cappa mediante utilizzo di anemometro.

Questa metodologia di verifica fa riferimento alle specifiche previste dalla NSF/ANSI 49 che prevede la riduzione dell'apertura frontale ad un'altezza di 7 cm e un minimo di due campionamenti ogni 30 cm di larghezza del fronte cappa.

Per tutti i dispositivi di Classe II vengono eseguiti un minimo di 6 rilievi della velocità, della durata di 60 secondi ciascuno, mediante utilizzo di sonda anemometrica unidirezionale.



Il metodo INDIRETTO, invece, consiste nella determinazione della portata di espulsione mediante rilievo della velocità dell'aria espulsa e misura della superficie netta di espulsione. La portata così determinata viene riportata alla superficie di apertura del fronte cappa per il calcolo della velocità di inflow.

I criteri di accettazione delle velocità variano in funzione della norma tecnica di riferimento e della specifica tipologia di DPC in esame secondo le classificazioni previste dalle UNI EN 12469 - NSF/ANSI 49.

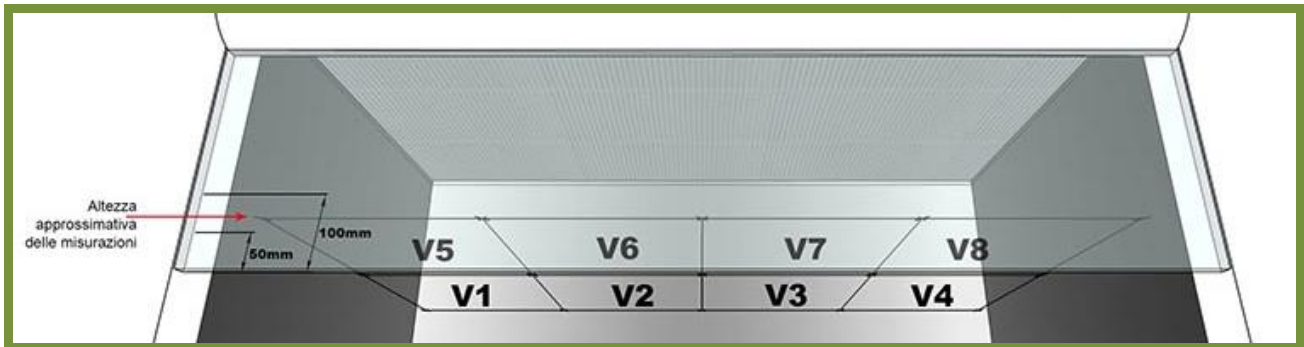
I criteri di accettazione utilizzati nel corso delle prove sono quelli definiti dalla norma tecnica comunitaria (UNI EN 12469) che prevede un valore di velocità media  $V_{ma} \geq 0,4$  m/s e nessuna delle singole misure può differire dal valore medio di  $\pm 20\%$ .



**PROVE ON SITE: VERIFICA DEL FLUSSO LAMINARE VERTICALE (DOWNFLOW)– rif. 2) D**

Verifica dell'uniformità della velocità dell'aria in uscita dai filtri assoluti secondo le specifiche disposte dalla UNI EN 12469.

I rilievi vengono effettuati mediante misurazione delle velocità, con sonda anemometrica e cappa in funzione, al centro di otto aree di una griglia ottenuta dall'intersezione di tre linee orizzontali e cinque linee verticali. Il dimensionamento della griglia di prelievo viene realizzato secondo i requisiti della UNI EN 12469.



La sonda anemometrica viene posizionata ad un'altezza compresa tra 50 e 100 mm al di sopra del bordo inferiore del vetro frontale.

Vengono rispettati i criteri di accettazione se la velocità media in uscita del filtro di mandata della cabina risulta:  $0,25 \leq V_{ma} \leq 0,50$  e se ciascuno degli 8 valori rilevati non eccede il valore di  $V_{ma} \pm 20\%$ .

**PROVE ON SITE: VERIFICA DELLA CLASSE DI PULIZIA AMBIENTALE – rif. 2) E**

Le prove eseguite per la valutazione della classe di contaminazione ambientale di un DPC interessano almeno due classi di particelle per le quali è previsto un limite.

La scelta delle classi viene effettuata tenendo conto che il rapporto dimensionale tra i diametri delle particelle delle classi di riferimento rispetti il requisito  $D_2 \geq 1,5 \cdot D_1$ .

I campionamenti vengono eseguiti posizionando la sonda di prelievo ad una distanza di circa 150 mm dal filtro HEPA. Il numero minimo di punti di prelievo (NI) è definito nella tabella A1 della UNI EN ISO 14644-1:2016 e dipende dalla superficie della "camera" (es. per  $A < 2\text{m}^2$  si dovrà campionare in un solo punto).

Il volume minimo di campionamento per ogni singolo punto di prelievo viene espresso dalla formula:  $V_s = (20/C_{n,m}) \cdot 1000$  dove  $C_{n,m}$  è il limite di classe, ovvero il numero massimo di particelle permesse per  $\text{m}^3$  e riferito alla classe con il diametro maggiore.

I prelievi vengono eseguiti su tre prove come specificato dalla norma tecnica di riferimento (cfr. UNI EN ISO 14644-1:2001 All. B punto B.3.4.) al fine di fornire una garanzia supplementare del corretto funzionamento/installazione del filtro HEPA.

Il volume totale campionato dipende dalla tipologia del DPC verificato e non sarà comunque inferiore a 750 litri totali, mentre per DPC gestiti in GMP il volume sarà di almeno 1000 litri.



**PROVE ON SITE: VERIFICA DELL'EFFICIENZA DEI DISPOSITIVI FILTRANTI (LEAK E INTEGRITY TEST) – rif. 2) F**

Verifica dell'integrità dei filtri assoluti (HEPA/ULPA) e della tenuta delle guarnizioni degli stessi.

Il test viene eseguito mediante scansione perimetrale (tenuta delle guarnizioni) e interna del dispositivo filtrante (valutazione di eventuali discontinuità o crepe), mediante *Natural Aerosol Challenge Method* (UNI EN ISO 14644 e UNI EN 12469), utilizzando la contaminazione particellare dell'aria ambiente e un conta particelle laser (Discrete Particle Counter).

Le guarnizioni sono considerate a tenuta e i filtri integri quando ove vengano rispettati i requisiti previsti per la classe ISO 5 che prevede un numero massimo di particelle di 3520 per m<sup>3</sup> per la classe da 0,5 µm.

**PROVE ON SITE: VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI CONTENIMENTO – rif. 2) G**

Il test che definisce la capacità di contenimento per le cabine di sicurezza biologica verrà eseguito mediante utilizzo di un dispositivo, dotato di un disco rotante che nebulizza ioduro di potassio (KI), denominato KI-DISCUS.

L'aerosol nebulizzato dal disco rotante a 28.000 giri al minuto all'interno della DPC tende a distribuirsi omogeneamente in tutte le direzioni (sia all'interno del DPC che al suo esterno).

Quattro bocchette di aspirazione dotate di dispositivi filtranti sono posizionate all'esterno della cabina di sicurezza biologica. I flussi di aspirazione dei quattro collettori, il loro posizionamento reciproco e le tipologie di setti filtranti devono essere conformi ai requisiti richiesti dalla UNI EN 12469.

Quota parte dell'aerosol nebulizzato verrà aspirato dai collettori e intercettato dai dispositivi filtranti.

Alla fine del periodo di campionamento le membrane filtranti vengono immerse in una soluzione di cloruro di palladio che, reagendo con lo ioduro di potassio presente sui filtri formerà "dots" di ioduro di palladio di colore marrone facilmente identificabili sul filtro.

Un numero di "dots" superiori a 60 certificherà il cattivo esito del test.

Per ciascuno dei punti di campionamento individuati dovrà essere eseguito un numero di ripetizioni non inferiore a 5.



Il test di contenimento, oltre a individuare difetti a livello della capacità di ritenzione della barriera frontale, è in grado di mettere in evidenza la presenza di altre problematiche. Un difetto di ritenzione del filtro di espulsione, ad esempio, comporta la re immissione nell'aria di particelle, in questo caso patogene, che si ripresentano all'altezza della barriera frontale.

Questo test, comunemente considerato un type-test (test di omologazione) e un test opzionale al momento dell'installazione e collaudo, non rientra nei test di routine (EN 12469), tuttavia ha una grande importanza per le informazioni che fornisce riguardo a protezione, salute degli operatori e quindi alla sicurezza dell'ambiente. Sarebbe dunque consigliabile estenderne l'applicazione a installazione e collaudo e addirittura alla routine periodica.

**PROVE ON SITE: LIVELLO DI PRESSIONE SONORA – rif. 2) H**

La verifica del livello di pressione sonora definisce il livello di rumorosità associato al DPC in dB(A) e la conseguente esposizione degli operatori a fonti di rumore oltre soglia dannose per l'organismo.

Il test viene eseguito mediante impiego di un fonometro. Prima di procedere all'esecuzione dei rilievi a motore acceso viene eseguita una rilevazione del rumore di fondo a cappa spenta (cfr. UNI EN 12469) secondo i criteri successivamente specificati. Le misurazioni vengono eseguite sul fronte cappa ad una quota pari alla disposizione dell'orecchio dell'operatore (cfr. 1500 mm dal piano di appoggio dello strumento, se in piedi, - 800 mm dall'altezza della seduta) e ad una distanza di 200 mm dal fronte cappa. Individuata la quota di riferimento, le misurazioni vengono eseguite su 5 punti tra loro equidistanti su tutto il fronte cappa. (cfr. UNI EN ISO 11202 e UNI EN 12469).

Se il rumore di fondo è superiore a 55 dB(A), e la differenza tra quest'ultimo e il livello di pressione sonora rilevato a DPC acceso risulta inferiore a 10 dB(A), il livello di pressione sonora potrà essere decurtato di un contributo previsto dalla normativa di riferimento.

La compensazione rispetto ai valori definiti in tabella potrà essere applicata solo nel caso in cui il livello di pressione sonora a DPC acceso risulterà superiore a 65 db(A).

La verifica si ritiene superata ove la media dei livelli sonori riscontrati, previa detrazione (ove applicabile) dei contributi derivanti dalle eventuali compensazioni, risulti inferiore a 65 dB(A).

**PROVE ON SITE: ILLUMINAMENTO – rif. 2) I**

La verifica dell'intensità luminosa dei neon luce presenti all'interno della cappa è fondamentale al fine di valutarne il corretto funzionamento per garantire la sicurezza dell'operatore. Una scarsa illuminazione del piano di lavoro potrebbe comportare uno sforzo eccessivo per la vista dell'operatore e un incremento della percentuale di errore nelle lavorazioni.

Il test viene eseguito mediante impiego di una sonda luxmetrica collegata a un analizzatore multi parametrico.

La prova viene eseguita a neon accesi posizionando il sensore sul piano di lavoro ed eseguendo un minimo di 8 misure per m<sup>2</sup> di superficie rilevando, per ciascuna delle misure eseguite, il grado di illuminamento della superficie (lux).

In aggiunta alle prove richieste viene eseguita anche una valutazione dell'illuminamento di fondo (neon spento) al fine di rilevare la presenza di eventuali sorgenti luminose esterne in grado di interferire sull'illuminamento del piano di lavoro.

La metodologia di campionamento è stata definita sulla base dei requisiti della UNI EN ISO 14175.

La media dei valori riscontrati sui punti di prelievo non deve essere inferiore a 750 lux. In caso contrario sostituire il neon luce onde evitare rischi per l'operatore (cfr. UNI EN 12469).

**PROVE ON SITE: VERIFICA DELLA DERIVA TERMICA – rif. 2) J**

Prova che consiste nella verifica della differenza di temperatura che esiste tra l'interno e l'esterno del DPC in condizioni di normale funzionamento di quest'ultimo.

Differenziali di temperatura troppo elevati potrebbero influire negativamente sulle caratteristiche fluidodinamiche di riferimento per un dispositivo di sicurezza biologica.

Mediante sonda termometrica (es. termocoppia di tipo "K") viene valutata la temperatura ambientale del laboratorio. La stessa strumentazione viene utilizzata per la valutazione della temperatura interna al DPC in condizioni di operatività stazionaria di quest'ultimo.

Il test si ritiene superato ove la differenza tra la temperatura dell'ambiente esterno e quello interno al DPC non eccede il valore di 8°C.

**PROVE ON SITE: PROVE MICROBIOLOGICHE – rif. 2) K**

Il Monitoraggio microbiologico delle cappe viene eseguito effettuando controlli dell'aria e delle superfici di lavoro all'interno delle stesse.

I campionamenti in aria e sulle superfici vengono effettuati in condizioni "at rest".

Per la determinazione dei valori limite, sono stati presi a riferimento quelli riportati nella tabella, presente su EEC GMP ANNEX 1 VOL IV 2008:

**Contaminazione microbiologica dell'aria**

La determinazione della carica microbica in aria viene effettuata posizionando lo strumento all'interno della cappa biohazard, generalmente nella zona centrale, così da rendere omogenea l'aspirazione dell'aria. Viene utilizzato un campionatore attivo in grado di prelevare un volume d'aria nota.

Per ogni punto sono stati prelevati 1000 litri di aria.

L'aria aspirata viene filtrata da piastre sterili con terreni nutritivi specifici e selezionati per la ricerca dei microrganismi.

In particolare, la verifica microbiologica della contaminazione aerodispersa si fa riferimento alla : "*Conta dei microrganismi a 30°C*".

**Contaminazione microbiologica delle superfici**

La valutazione della contaminazione delle superfici ("*Conta dei microrganismi a 30°C*") è indirizzata alla determinazione della carica microbica presente sulle stesse e viene eseguita su 5 punti: quattro ai vertici del piano di lavoro del dispositivo e uno in zona centrale.

I prelievi vengono effettuati per determinare l'efficacia delle tecniche di pulizia delle superfici, dopo il termine delle operazioni di sanificazione e dopo l'utilizzo delle lampade UV di ciascuna cappa.

Il metodo di prelievo utilizzato è quello per contatto, con un tempo di residenza superiore ai 10 secondi, e con un'applicazione di una pressione uniforme e costante all'intera area.

Nel caso delle cappe con classe attesa A, il limite riportato dalla GMP per la carica microbica sulle superfici è <1 UFC/piastra.



**QUADRO DI SINTESI CABINE DI SICUREZZA MICROBIOLOGICA**

ATTIVITA'	Pacchetto 1	Pacchetto 2	Pacchetto 3	Note
Ispezione visiva delle parti costituenti	X	X	X	-
Ispezione visiva dell'assemblaggio	X	X	X	-
Ispezione della documentazione	X	X	X	-
Air Room Velocity test		X	X	-
Smoke test	X	X	X	-
Verifica del flusso in ingresso (Inflow)	X	X	X	-
Verifica del flusso laminare verticale (Downflow)	X	X	X	-
Verifica della classe di pulizia ambientale		X	X	-
Verifica dell'efficienza dei dispositivi filtranti (Leak e integrity test)		X	X	-
Valutazione dell'efficienza di contenimento			X	-
Livello di pressione sonora		X	X	-
Illuminamento		x	x	-
Prove microbiologiche		X	X	-