



Certificazione in accordo a EN 12469 per cabine di sicurezza microbiologica

Articolo da noi pubblicato sul numero 4/2020 di Ascca News. Autori: Dario Zucchelli e Luca Zucchelli

Le Cabine di Sicurezza Microbiologica – più in breve MSC dette comunemente “bio hazard” - in Europa hanno come norma di riferimento la UNI EN 12469:2001. La rigorosa applicazione dei test prescritti da questo standard è necessaria per validare il processo di contenimento, tale certificazione è rigorosamente richiesta soprattutto in epoca di pandemia dai regolamenti normativi emanati dalle Autorità governative. In questo breve articolo si elencano i principali requisiti costruttivi e prestazionali per tali Dispositivi di Protezione Collettiva (DPC) utilizzati in un processo asettico a biocontaminazione controllata.

Tra le norme europee sulla sicurezza nelle biotecnologie, fondamentale importanza ha la norma EN 12469, lo standard armonizzato in materia di cabine di sicurezza microbiologiche (figura a fianco), il cui fine è quello di indicare i requisiti in materia di costruzione e di prestazioni. Nel 2000, anno della sua introduzione, che sostituì i precedenti standard tedeschi, inglesi e francesi riguardanti lo stesso campo di impiego. Invece, in America lo standard di riferimento è l'ANSI/NSF49. Quest'ultimo nel 2002 è stato l'anno in cui ha ottenuto il riconoscimento ufficiale dall'ANSI (American National Standards Institute) mentre nel 2009 è stato sottoposto a revisione. L'NSF49 era in vigore dal 1970 ed è senza dubbio il più vecchio standard in questo settore nell'ambito mondiale.

1. Terminologia

Le cabine di sicurezza microbiologica sono classificate dalla EN 12469 in 3 tipologie: Cabine di classe I, di classe II e di classe III. **La cabina di classe I** è un DPC la cui funzione è quella di proteggere l'operatore, ma non il campione su cui sta lavorando. L'aria non è filtrata in entrata, con conseguente possibile contaminazione crociata da parte dell'ambiente e dei materiali non sterili, ma è filtrata in uscita tramite filtri assoluti. Tali cappe sono adottate per la manipolazione di microrganismi di gruppo I-II, esclusi quelli patogeni.

La cabina di classe II è un DPC la cui funzione è quella di proteggere sia l'operatore, sia il campione, garantendo condizioni di assoluta sterilità. Da tale cappa esce verso l'esterno il 30% dell'aria, mentre il restante 70% rimane nella cappa: la funzione della parziale fuoriuscita dell'aria è di creare una depressione che la richiama all'interno, in modo da instaurare un flusso verticale continuo, in modo che i microrganismi non fuoriescano dall'ambiente di lavoro e non contaminino l'operatore (nel caso di microrganismi patogeni). Tale cabina è indicata per la manipolazione di microrganismi di gruppo II e di gruppo III.

La cabina di classe III è un DPC la cui funzione è quella di isolare completamente l'operatore dal campione che manipola e non esporlo a rischi di contagio con virus patogeni di gruppo IV. Tale cappa è completamente chiusa ed ermetica: l'operatore manipola gli agenti biologici tramite guanti fissi che lo

isolano completamente. Le cappe di classe III filtrano l'aria sia in entrata che in uscita e assicurano all'ambiente interno una pressione negativa. Tali cappe sono adottate in laboratori in cui si manipolano agenti biologici di gruppo IV. La EN 12469 si applica alle cabine biologiche di sicurezza di classe I, II e III mentre la NSF49 riguarda solo le cabine di sicurezza di classe II. Va subito detto che questa differenza, sebbene evidente, non ha grandi conseguenze poiché le cabine di classe II sono quelle maggiormente



utilizzate in tutto il mondo.

Andrebbe inoltre notato che non esiste differenza tra una “cabina di classe II secondo la norma europea” e una “cabina di classe II secondo lo standard americano”.

Entrambe infatti forniscono una protezione sia per il prodotto, che per l'operatore e anche per l'ambiente - funzionando tramite gli stessi principi (flusso verticale filtrato in grado HEPA (o ULPA) sulla zona di lavoro, filtro di espulsione HEPA (o ULPA), ecc.).

La principale differenza in questa aerea è che l'NSF49 definisce una serie di sottotipi di cabine di Classe II (il tipo definito A2 è quello maggiormente utilizzato negli Stati Uniti).

Va ancora sottolineato che le cabine di classe II disponibili sul mercato europeo conformi alla EN 12469 sono potenzialmente identiche nei termini di costruzione (sebbene con qualche piccola differenza) a quelle americane di tipo A2.

2. Misure prestazionali e analisi fisiche

La EN 12469 è una norma basata sulle prestazioni di contenimento dell'apparecchiatura di sicurezza. Questo vuol dire che l'enfasi dello standard non è sui requisiti di costruzione (non si dirà al produttore come costruire la cabina secondo determinate specifiche) ma piuttosto su determinati criteri prestazionali in campo (mentre il costruttore ha un ampio grado di libertà nel definire il progetto della sua cabina a condizione che vengano rispettati i criteri asettici e di contenimento fisico).

Degli esempi di test di controllo sono: analisi microbiologiche per la verifica del grado di protezione dell'operatore, protezione del prodotto e protezione dalla contaminazione incrociata, lettura della velocità del flusso d'aria, *smoke test* sul flusso dell'aria (la differenza tra questi test è specificata nella Tabella riportata nella pagina che segue saranno meglio analizzati di seguito). Lo scopo della EN 12469 è infatti quello di dettagliare i parametri di analisi e i criteri di accet-

Prove di omologazione e test di verifica periodica in laboratorio

EN 12469 - Metodi per prove di tipo, test d'installazione, verifiche e manutenzione periodica su cappe microbiologiche di classe I e II

Testing	Contenimento dell'apertura frontale	Tenuta involucro della cappa	Filtri per aria*	Protezione del prodotto (solo per classe II)	Contaminazione incrociata (solo per classe II)
Prove di tipo	- metodo microbiologico oppure test KI-discus (vedi appendice C)	- metodo di prova alla nolla di sapone (vedi appendice B)	- metodo dell'aerosol naturale ambientale (vedi appendice D)	- metodo microbiologico (vedi appendice E)	- metodo microbiologico (vedi appendice F)
Prove di installazione	- verificare che i requisiti di specifica del costruttore siano soddisfatti; - verifiche volumetriche con misurazioni di portata d'aria (vedi p.e. appendici G e H); - oltre a - verifica andamento dei flussi d'aria (visualizzazione); - facoltativi: test di contenimento (vedi appendice E), di tipo microbiologico oppure in alternativa metodi light scattering quali KI-discus test, dopo la validazione.	Non applicabile	- metodo mediante aerosol tracciante (vedi appendice D); oppure - nel caso usare l'aerosol naturale ambientale come metodo di confronto*	- verificare che i requisiti di specifica del costruttore siano soddisfatti; - verifiche volumetriche con misurazioni di portata d'aria (vedi p.e. appendici G e H); - oltre a verifica andamento dei flussi d'aria (visualizzazione); - facoltativi: test di contenimento (vedi appendice E), di tipo microbiologico oppure in alternativa metodi light scattering quali KI-discus test, dopo la validazione.	- verificare che i requisiti di specifica del costruttore siano soddisfatti
Manutenzione e test di verifica periodici (vedi appendice K)	- controllare i requisiti specifici del produttore per la manutenzione; - verifiche volumetriche con misurazioni di portata d'aria (vedi per esempio le appendici G e H); - oltre a - verifica andamento dei flussi d'aria (visualizzazione)	Non applicabile	- come per le prove di installazione	- controllare i requisiti specifici del produttore per la manutenzione; - verifiche volumetriche con misurazioni di portata d'aria (vedi per esempio le appendici G e H); - oltre a - verifica andamento dei flussi d'aria (visualizzazione)	- controllare i requisiti specifici del produttore per la manutenzione; - verifiche volumetriche con misurazioni di portata d'aria (vedi per esempio le appendici G e H); - oltre a - verifica andamento dei flussi d'aria (visualizzazione)

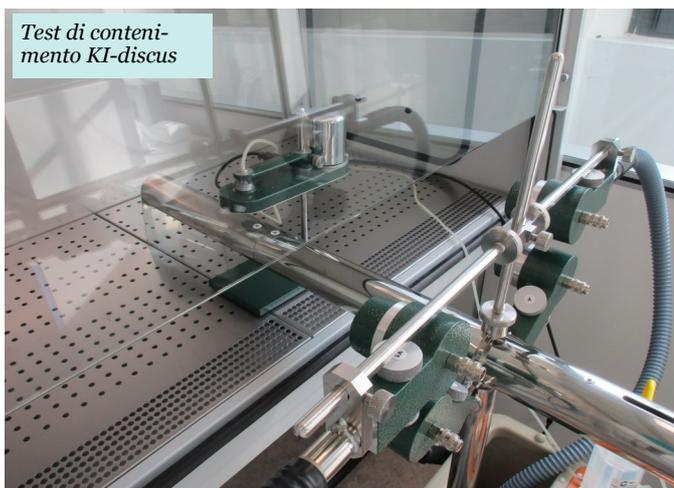
NOTA: I regolamenti nazionali possono richiedere la valutazione dei rischi e possono richiedere ulteriori requisiti in casi particolari, ad esempio se microrganismi altamente pericolosi devono essere utilizzati oppure se il rischio di infezioni aumenta per via aerea. * Informazioni sui filtri è dato nella norma EN 13091: 1999.

3. Test prestazionali e criteri di accettazione

La norma europea ha una serie di metodi di prova per eseguire i test prestazionali e criteri raccomandati, di cui riportiamo di seguito le principali caratteristiche.

a) Test KI-discus per la protezione di operatore, prodotto e contaminazione crociata

In questo contesto, fondamentalmente la EN 12469 ha adottato i metodi di analisi della NSF49. Infatti i criteri di accettazione sono praticamente gli stessi. Va comunque detto che la EN 12469 quando si parla di test per la protezione dell'operatore prescrive e consiglia sul campo un metodo alternativo più pratico - il KI Discus (test che utilizza un aerosol di Ioduro di Potassio) - rispetto a quello per la prova microbiologica. Il KI-Discus è l'unico aspetto per cui lo standard europeo è senza dubbio superiore a quello americano. È infatti l'unico modo per validare, sul campo, la capacità di contenimento della cabina.

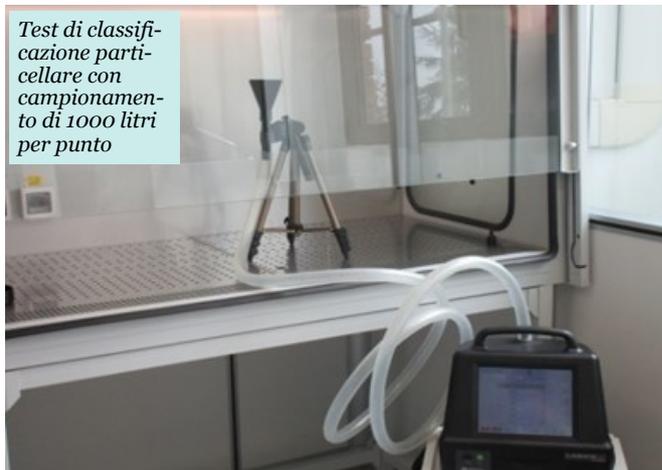


Test di contenimento KI-discus

A differenza tra i tradizionali test della prova microbiologica per la protezione dell'operatore che forniscono solo un risultato positivo o negativo, il KI-Discus fornisce un grado di protezione dell'apertura frontale della cabina, richiedendo un fattore di protezione superiore a 10.000.

Ciò significa che solo 1 particella su 10.000, generata nel punto più debole della barriera frontale di protezione, può uscire dalla cabina. Tenendo conto che le cabine devono essere almeno di classe ISO 5 corrispondere alla di classe 100 (Fed.Std. 209) è praticamente un contenimento totale.

Test di classificazione particellare con campionamento di 1000 litri per punto



b) Velocità del Downflow

La EN 12469 specifica un range ammissibile della velocità del flusso d'aria discendente sul prodotto di 0.25-0.50 m/s. La velocità del downflow ha un effetto diretto sulla protezione del prodotto e sulla contaminazione incrociata sul piano di lavoro della cabina. Per esempio, basse velocità del downflow possono comportare una minore protezione del prodotto. Sul metodo di misurazione del flusso si consiglia l'utilizzo di un anemometro con un certo livello di accuratezza nella misurazione.



Test di velocità down-flow del flusso d'aria discendente

c) Velocità del flusso d'aria nella barriera frontale di protezione

Circa la metodologia, l'EN 12469 effettua le misurazioni sopra il filtro assoluto di estrazione del DPC. Tale metodo per effettuare le misurazioni sull'elemento filtrante di espulsione è già utilizzato negli Stati Uniti. Lo standard specifica anche i requisiti minimi di velocità del flusso della barriera frontale in entrata. Il requisito delle cabine di classe II richiede un valore minimo di 0.4 m/s.

d) Caratteristiche costruttive della cabina

Per l'insieme delle prestazioni di una cabina di sicurezza biologica si intendono complessivamente i diversi valori di velocità dell'aria (velocità del downflow e della barriera frontale) all'interno dei quali il DPC supererà tutte le prove microbiologiche. La norma EN 12469 è molto rigorosa in questo senso e richiede che durante i test di controllo prestazionale e di qualità svolti sia dal produttore che direttamente nel luogo di installazione, la cabina abbia un velocità di downflow e di barriera frontale entro il range di velocità specificate dalla normativa.

e) Analisi secondarie per il comfort dell'operatore: rumore, luce, vibrazione.

Circa il test sul rumore il metodo previsto dallo standard europeo definisce per la misurazione una determinata distanza dalla cabina (1 m dal centro dell'apertura). La EN 12469 richiede un livello massimo di rumorosità di 65 dB(A).

Per il test sulle vibrazioni non esistono diversità tra gli standard europeo e americano. Infine, in merito al test sulla illuminazione la norma europea richiede un valore di 750 lux.

f) Prova di tenuta (Leak test) del filtro HEPA/ULPA

La recente revisione della norma EN 1822 (2019), con la contemporanea entrata in vigore della norma globale ISO 29463, richiede per i filtri assoluti un test d'integrità ovvero un leak test sul filtro mediante un fotometro di massa con un aerosol tracciante (per esempio DOP, Emery 3004/PAO), mentre la EN 12469 originaria permetteva l'utilizzo della contaminazione naturale presente nell'ambiente di fondo. In realtà la norma europea stabiliva già alle origini che il "natural aerosol challenge test" dell'ambiente poteva essere effettuato solamente dove applicabile, mentre in ambienti a contaminazione controllata come nelle cleanrooms o nelle cabine con tre filtri doveva essere utilizzato il "challenge test method" con generatori di aerosol traccianti quali DOP, DOS o Emery Oil.



Smoke test sull'andamento dei flussi d'aria all'esterno/interno della cabina.

h) Soap bubble pressure leak test

La NSF49 richiede inoltre il bubble test per la verifica della tenuta della carcassa del DPC come test di routine a carico del produttore su tutte le unità costruite in fabbrica, mentre lo standard europeo lo richiede solo come un "test di tipo" a carico dei laboratori di certificazione notificati.

i) Altri test

La NSF49 specifica alcuni altri test (per esempio condotti dalla NSF durante il processo di certificazione). Questi includono l'analisi della resistenza chimica ed abrasiva della verniciatura della postazione di lavoro esterna e il test di prestazione dell'elettroventilatore. Mentre questi test aiutano a stabilire certi criteri minimi di costruzione non hanno un effetto diretto sulla sicurezza della cabina ma solo sulla manutenzione.

4. Requisiti di costruzione della cabina

La NSF49 tende ad essere maggiormente dettagliata in termini di requisiti di costruzione, ponendo grande enfasi sui problemi legati alla pulizia della cabina. Alcune delle più importanti differenze comunque sono che la NSF49 non consente la presenza di materiale fonoassorbente all'interno delle aree contaminate nella cabina.



Test fotometrico di integrità integrale con stampa tracciabile del grado di efficienza puntuale

g) Smoke test sul flusso d'aria

Prova di ispezione visiva sull'andamento del flusso d'aria nella cabina. La specifica vale globalmente in tutto il mondo per quanto riguarda la metodologia di prova e i criteri di accettazione (Fig. 6) attraverso una evidenza filmata registrata su CD o altro supporto informativo.

h) Soap bubble pressure leak test

La NSF49 richiede inoltre il bubble test per la verifica della tenuta della carcassa del DPC come test di routine a carico del produttore su tutte le unità costruite in fabbrica, mentre lo standard europeo lo richiede solo come un "test di tipo" a carico dei laboratori di certificazione notificati.



Le cabine americane tendono quindi ad essere in generale più rumorose. Inoltre la NSF49 non richiede un sistema di allarme per il flusso d'aria, come è invece richiesto dalla EN 12469. Questo dipende dalla natura dell'industria negli Stati Uniti, dove un tecnico verificatore di cabine è prontamente disponibile ovunque sia locata la cabina sul territorio americano.

D'altro canto, il mercato europeo, a causa del suo elevato grado di frammentazione, ha dovuto far conto su sistemi di allarme poiché le società di certificazione potrebbero non essere sempre disponibili nell'immediato in tutte le regioni europee.



Gruppo Italiano Delta

FILTRATION & VALIDATION JOURNAL OF AIR PURIFICATION

Direttore Responsabile: Dario Zucchelli
Ordine dei Giornalisti N° 70083 Elenco Pubblicisti
dario.zucchelli@alice.it

Via Zucchi 39/B - 20095 Cusano Milanino
Tel. 02 66409991 - Fax 02 6194115
info@ctsc.com.it

All'avanguardia del futuro



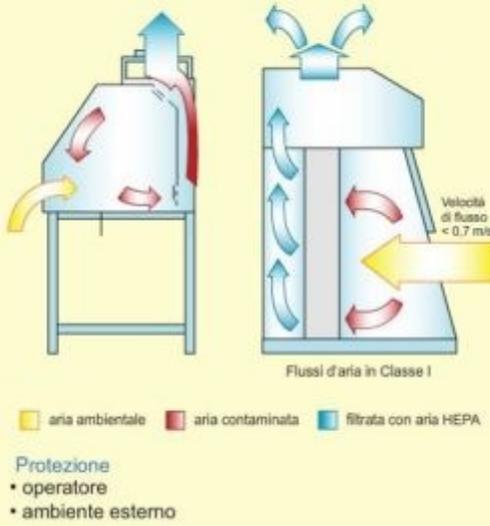
il Parere del Tecnico

A cura di Luca Zucchelli

In questo numero di Filtration & Validation si sono sottolineati i requisiti fondamentali di rigorosa "certificazione" delle cabine di sicurezza microbiologica che deve essere rilasciati unicamente da laboratori indipendenti riconosciuti. Tale validazione costituisce l'evidenza documentale di sicurezza delle cabine microbiologiche. Ma è pur vero che purtroppo è cattiva consuetudine degli utenti di avvalersi in economia di aziende di manutenzione di bassa professionalità che non rispettano gli stringenti requisiti normativi richiesti ma che rilasciano generiche "check list". È opinione degli autori che il livello di qualità e sicurezza per l'utilizzatore è maggiore, nelle cabine microbiologiche europee. Infine va detto che il requisito di un sistema di allarme per il flusso d'aria è un plus imprescindibile a condizione che le cabine operino secondo le istruzioni del produttore e attraverso personale qualificato attraverso specifici corsi di formazione sia sul funzionamento delle cabine che sull'esecuzione dei test di controllo.

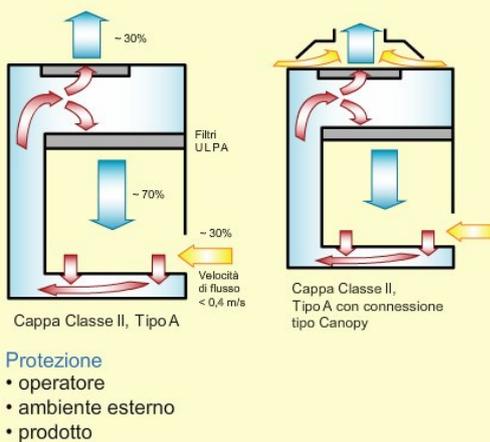
Classificazione delle cabine di sicurezza microbiologica a flusso unidirezionale

Cappe a sicurezza biologica di classe I Cappa ventilata aperta frontalmente



Classe I: cabina provviste di apertura frontale, la protezione è possibile grazie al flusso dell'aria diretto dall'esterno all'interno della cappa attraverso l'apertura frontale. La protezione ambientale viene realizzata tramite un filtro HEPA nel sistema di scarico. Non proteggono il campione da contaminazione e sono adatte per utilizzi con agenti biologici a basso e medio rischio;

Cappe a sicurezza biologica di classe II Tipo A1



Classe II: cabina la cui funzione è quella di proteggere sia l'operatore, sia il campione. Tale cappa è formata da un piano di acciaio inossidabile forato, che permette l'entrata dell'aria preventivamente filtrata attraverso un sistema di filtri HEPA, uno in entrata e uno in uscita. Da tale cappa esce verso l'esterno il 30% dell'aria, mentre il restante 70% rimane nella cappa, garantendo condizioni di assoluta sterilità. L'aria entra all'interno della cappa con un flusso verticale, in modo che i microrganismi non fuoriescano dall'ambiente di lavoro e non contaminino l'operatore.

Cappe a sicurezza biologica di classe III "glove box" (vedi sezione dedicata isolatore).



Classe III: Cabina 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 cui la denominazione di "glove box". Hanno un filtro HEPA sull'aria in ingresso ed un doppio filtro HEPA sull'aria in uscita, permettono una protezione totale dell'operatore e dell'ambiente, sono perciò adatte per la manipolazione ad alto rischio biologico e sono utilizzate anche in caso di manipolazioni con agenti cancerogeni e antiblastici.