

Sistema di monitoraggio in continuo in una cleanroom ospedaliera

*T. Venezian - L. Roseti - P.M. Fornasari (Banca del Tessuto Muscoloscheletrico – Istituti Ortopedici Rizzoli di Bologna)
A. Calda, D. Grioni (A.&L.CO Industries s.r.l. Cologno Monzese – Milano)
M. Petrone (Qualified Services - Cologno Monzese - MI)*

La gestione di ambienti a contaminazione controllata è una realtà sempre più diffusa in ambito ospedaliero, per la produzione di prodotti biologici assimilabili ai farmaci, nel campo degli studi clinici o pre-clinici

Parole chiave: Medicina rigenerativa - Staminali mesenchimali – Condrociti
Monitoraggio in continuo

Introduzione

La crescente richiesta di strategie terapeutiche biologiche, soprattutto in considerazione dell'incremento della popolazione anziana con malattie degenerative del sistema scheletrico, ha portato la Banca del Tessuto Muscoloscheletrico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli a realizzare una cleanroom con laboratori in classe A e B, monitorati in continuo, come previsto dall'Annex 1 delle euGMP che recita: "A continuous measurement system should be used for monitoring the concentration of particles in the grade A zone, and is recommended for the surrounding grade B areas"

Va subito ricordato che in campo ortopedico, lo sviluppo della bioingegneria e dell'ingegneria dei tessuti sta aprendo nuove prospettive alla realizzazione della "medicina rigenerativa", il cui obiettivo è la ricostruzione biologica dei tessuti dell'apparato locomotore.

Negli ultimi dieci anni le cellule staminali mesenchimali sono state utilizzate in una serie di studi preclinici, sia in modelli animali che in esseri umani, per dimostrare la loro efficacia per la ricostruzione di difetti ossei.

In tale ottica, si inserisce anche il trapianto autologo di condrociti, utilizzato per la riparazione di difetti cartilaginei.

Questa emergente opzione terapeutica richiede, oltre a competenze chirurgiche, il controllo della tecnica di coltura di condrociti in ambienti a contaminazione controllata e in accordo alle correnti norme di Buona Fabbricazione – cGMP. Una frontiera ancora più innovativa è rappresentata dalla possibilità di utilizzare cellule staminali mesenchimali adulte differenziate in senso condrogenico.

Prima di affrontare l'aspetto ingegneristico, presentiamo una breve panoramica scientifica sulle cellule staminali e sui condrociti.

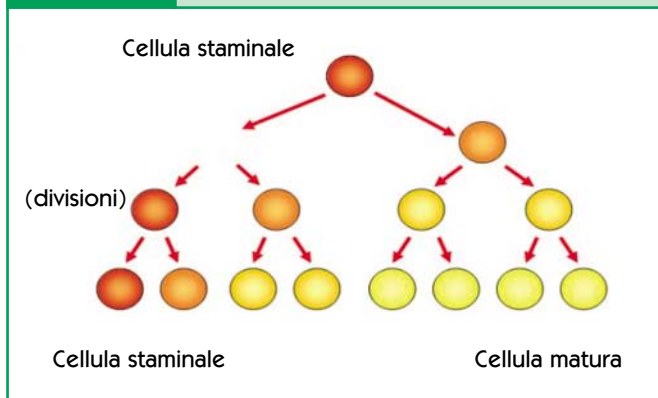
Staminali Mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali sono una popolazione cellulare pluripotente che, se adeguatamente indirizzate, possono dare origine a cellule con caratteristiche di vari tessuti come quello osseo, cartilagineo o adiposo.

Grazie alla loro capacità di differenziare in senso osteogenico queste cellule sono state ampiamente studiate per trovarne applicazione in campo ortopedico.

Le cellule staminali sono cellule che, ad ogni divisione, danno origine ad una cellula identica a se stessa ed ad una maggiormente commissionata. Con questa divisione asim-

Fig. 1 Divisione asimmetrica della cellula staminali



metrica viene mantenuto inalterato il numero di cellule staminali, mentre le cellule maggiormente commissionate, dividendosi ulteriormente, daranno origine ad un numero rilevante di cellule mature che compongono i tessuti (vedi Figura 1).

In base a questa caratteristica le cellule staminali si distinguono in:

- totipotenti, capaci di trasformarsi in qualsiasi tipo di tessuto;
- pluripotenti, che si trasformano solo in alcuni tipi di tessuti;
- unipotenti, che possono dar luogo soltanto ad un tipo cellulare.

Le cellule staminali mesenchimali sono contenute all'interno dello stroma midollare ed una delle maggiori difficoltà che si incontrano nell'utilizzo in campo clinico di queste cellule è la loro scarsa presenza nel midollo. Quindi, per poter essere utilizzate, devono essere prelevate ed espanse in laboratorio per raggiungere un numero clinicamente rilevante.

Al di fuori del corpo (*ex-vivo*), le cellule staminali mesenchimali mantengono una buona capacità proliferativa e sono capaci di aderire a superfici quali vetro e plastica, che vengono comunemente utilizzate per la cultura delle cellule in laboratorio.

Schematicamente, il processo si distingue nelle fasi di:

- prelievo di cellule, mediante aspirazione dalla cresta iliaca;
- congelamento e conservazione;
- scongelamento;
- selezione ed espansione;
- impianto.

Il metodo utilizzato per l'espansione è cruciale e deve essere sicuro, efficace, facile da ottenere e poco costoso.

Per ottenere una espansione cellulare è necessario non solo "alimentare" le cellule, ma anche fornire loro dei segnali che le inducano a moltiplicarsi.

Nella pratica di laboratorio questo stimolo si traduce nell'esperire le cellule a delle proteine generalmente classificate come fattori di crescita. Questi fattori di crescita sono solitamente somministrati singoli in concentrazioni note, esponendo le cellule a singole proteine, oppure, come avviene nella maggior parte dei casi, esponendo le cellule a

svariati fattori di crescita a concentrazione non nota contenuti nel siero.

In un'ottica di utilizzo di cellule autologhe, ovvero del soggetto stesso, per una ricostruzione biologica di un tessuto, costituisce una prospettiva logica utilizzare per l'espansione delle cellule fattori di crescita autologhi. Questi fattori possono essere contenuti nel siero del soggetto a cui vengono prelevate le cellule o nelle sue piastrine. Oltre alla logica bisogna considerare che i fattori di crescita autologhi costituiscono un'opzione dai costi contenuti e con buoni margini di sicurezza.

Per quanto riguarda le piastrine i fattori di crescita autologhi vengono secreti dai granuli alfa o una volta indotta la loro aggregazione, o per la rottura delle loro membrane plasmatiche mediante shock termico.

La concentrazione dei fattori di crescita è incrementabile, prima della loro stessa estrazione, con metodologie semplici per l'ottenimento di Plasma Ricco in Piastrine - PRP. Nella procedura clinica le cellule espanse saranno autologhe, quindi prive di rischi di rigetto da parte del paziente. Gli obiettivi dello studio sono quello di valutare la sicurezza della applicazione di cellule staminali mesenchimali espanse *ex-vivo* nella riparazione di difetti ossei e di valutarne l'efficacia clinica confrontando i risultati ottenuti con quelli di soggetti trattati con metodiche alternative equivalenti in termini di percentuale di successo e tempo di riparazione tessutale.

Condrociti

I condrociti sono le unità morfologiche e funzionali del tessuto cartilagineo ed hanno la capacità di produrre la matrice circostante composta da fibre collagene e proteoglicani. La cartilagine articolare, che nell'adulto ricopre le superfici ossee delle diartrosi, ha la funzione di ridurre l'attrito durante il movimento e di assorbire, trasmettere e distribuire le forze di carico all'osso subcondrale.

Le lesioni della cartilagine articolare, di origine post-traumatica o degenerativa, rappresentano una patologia estremamente comune che interessa una gran parte di persone e che verosimilmente evolve in artrosi.

Il deterioramento del tessuto cartilagineo può colpire soggetti di qualsiasi età; il danno può insorgere a seguito di traumi (incidenti sportivi o stradali) o di patologie quali osteocondrite dissecante o condromalacia patellare.

Ogni lesione a carico della cartilagine articolare viene considerata come l'inizio di una malattia cronica degenerativa con poche possibilità di cura, a causa della scarsa capacità rigenerativa di questo tipo di cellule. Il paziente comincia quindi un percorso lento ma inesorabile che lo porterà ad una progressiva limitazione funzionale dell'arto, fino ad arrivare all'applicazione di una protesi.

La cartilagine è un tessuto difficile da trattare, perché è privo di irrorazione sanguigna (non è vascolarizzato) e di innervazione.

Il trattamento di tali lesioni è ostacolato dalla ridotta capacità rigenerativa della cartilagine; l'organismo genera

fibro-cartilagine che, al contrario del tessuto originale, presenta resistenza meccanica inferiore, non garantendo né la guarigione né la remissione dei sintomi.

Per il trattamento delle lesioni della cartilagine articolare sono state proposte diverse tecniche chirurgiche principalmente distinte in tecniche riparative e rigenerative.

Le tecniche riparative, pur portando ad un miglioramento in termini di riduzione del dolore e di incremento della mobilità, conducono alla formazione di un tessuto fibro-cartilagineo costituito principalmente da collagene di tipo I, che presenta caratteristiche di minore resistenza rispetto alla cartilagine ialina in cui predomina il collagene di tipo II.

Le tecniche rigenerative si prefiggono lo scopo più ambizioso di rigenerare il tessuto ialino, ma presentano anche esse dei limiti: quelle basate sull'impianto di materiali dotati di potenzialità condrogenica, quali pericondrio e periostio, presentano il limite di non garantire l'adesione fra il tessuto trapiantato e l'osso subcondrale; i trapianti osteocondrali hanno mostrato risultati incoraggianti, ma in alcuni casi si sono dimostrati immunologicamente attivi, soprattutto per quanto riguarda la componente sub-condrale.

Queste problematiche hanno stimolato la ricerca di soluzioni alternative: le recenti innovazioni nel campo delle colture cellulari hanno permesso di manipolare cellule autologhe ex vivo e di utilizzarle per trattamenti chirurgici riparativi senza modificarne il fenotipo e la funzionalità.

In particolare, la strategia terapeutica del trapianto di condrociti autologhi per la riparazione di difetti articolari ha destato notevole interesse in ambito ortopedico. L'approccio clinico nell'uomo ha interessato soprattutto la riparazione di lesioni a livello del ginocchio e della caviglia, in particolare per il trattamento negli sportivi e nei giovani.

L'innesto di condrociti autologhi trova applicazione nel trattamento delle lesioni cartilaginee del ginocchio, caratterizzate da: danni cartilaginei di origine traumatica o micro-traumatica ripetuta; lesioni localizzate, seppure estese; lesioni a carico dei condili femorali o della troclea femorale; lesioni a tutto spessore, contornate da cartilagine sana; dimensioni della lesione superiori a 1 cm²; osteocondriti dissecanti.

Il metodo è altresì applicabile nei casi di lesioni a carico della rotula; lesioni legamentose associate e difetti assiali associati (previa correzione chirurgica delle lesioni e dei difetti sopra citati); precedenti procedure chirurgiche sulle stesse lesioni condrali, con rispetto dell'osso subcondrale.

L'innesto di condrociti autologhi non è indicato in presenza di malattie degenerative delle articolazioni, come per esempio l'artrosi; infiammazioni delle articolazioni; tumori al ginocchio. In questi casi, infatti, la malattia continuerebbe ad aggredire anche il tessuto cartilagineo nuovo.

I condrociti autologhi vengono prelevati dalla stessa persona alla quale saranno reinnestati.

La tecnica, sinteticamente, consiste in: prelievo delle cellule cartilaginee dal paziente; coltura ed espansione in laboratorio (fino a renderle disponibili su una matrice di pochi centimetri); reimpianto nello stesso paziente, al fine di colmare difetti del tessuto.

Le cellule possono essere trasportate all'interno di strutture tridimensionali ed innestate direttamente all'interno della lesione condrale. L'impiego di supporti tridimensionali ("scaffold" o "carriers") consente infatti di migliorare l'attaccamento e la riproduzione cellulare, di trattenere le cellule nella zona da riparare e di dirigere l'orientamento spaziale dei componenti della matrice

Nel corso di vari studi sono stati individuati numerosi materiali che hanno permesso di definire le principali caratteristiche dei suddetti supporti quali porosità e tridimensionalità, bicompatibilità, biodegradabilità controllata, una struttura capace di favorire l'adesione, la proliferazione ed il differenziamento cellulare e riproducibilità.

Di particolare importanza per il trapianto di condrociti autologhi è la riespressione del fenotipo originale che viene perso durante l'espansione cellulare, di cartilagine ingegnerizzata.

L'abilità dell'industria a realizzare queste entità strutturali con diverse possibilità architettoniche rappresenta uno dei risultati più ambiti nella strategia della rigenerazione cartilaginea.

Impianto produttivo

Come già accennato sopra, la Banca del Tessuto Muscolo-scheletrico della Regione Emilia-Romagna presso gli Istituti Ortopedici Rizzoli, si è dotata dal 2004 di un impianto HVAC con una camera sterile di classe A, circondata da classe B, allo scopo di fornire prodotti minimamente manipolati senza la compromissione delle caratteristiche biomeccaniche ed induttive conseguente alla sterilizzazione tramite raggi gamma, che rappresenta la metodologia elettiva per tale tipologia di tessuto. La classificazione delle varie zone è stata effettuata conformemente a quanto previsto dall'annex 1 - EC Guide to Good Manufacturing Practice.

La camera sterile (superficie totale di circa 60 m²) è schematicamente costituita da:

- due laboratori di classe A (area a flusso unidirezionale limitata da cortine) e B (area circostante) (vedi Fig. 2);



- un laboratorio di classe B, recentemente aggiunto al progetto originale;
- tre bussole (spogliatoi di seconda vestizione), di classe B;
- tre pass box flussati;
- un'area di classe C per le attività meno critiche;
- uno spogliatoio di prima vestizione, di classe D.

Entrambi i laboratori sono dotati di incubatori a CO₂, cappe biohazard di classe A e di altre apparecchiature. Un liofilizzatore necessario alla processazione di tessuto muscolo-scheletrico è stato collocato in classe A per evitare qualsiasi transito del prodotto in classe B.

Componenti quali pompe e/o condensatori sono stati collocati fuori dall'area classificata.

I reparti produttivi e gli annessi spogliatoi sono completamente isolati gli uni dagli altri e le aree critiche sono protette da opportuni gradienti di pressione.

Le pressioni sono articolate in modo da determinare:

- un gradiente positivo ≥ 10 Pa se, rispetto all'ambiente comunicante, la classe è superiore di un livello;
- un gradiente positivo ≥ 20 Pa se, rispetto all'ambiente comunicante, la classe è superiore di due livelli;
- un gradiente negativo ≥ 5 Pa, tra i laboratori produttivi e le relative bussole di accesso, per evitare anche la remota possibilità di contaminazione verso l'esterno.

Il sistema HVAC è caratterizzato da:

- un'unità principale per il trattamento dell'aria;
- un'ulteriore unità di trattamento *di zona*, al fine di supportare l'ampliamento attuato;
- espulsioni d'aria connesse alla cappe biohazard (per proteggere da una potenziale contaminazione esterna);
- moduli di mandata aria, dotati di filtri assoluti con efficienza H14, posizionati sulla controsoffittatura degli ambienti;
- un sistema di controllo di temperatura ed umidità relativa con sonde poste sull'aria di ripresa degli ambienti.

Caratteristiche del sistema di monitoraggio

L'area a contaminazione controllata della BTM è dotata di un sistema di monitoraggio, particellare e microbiologico – *in continuo*, costituito da 4 sensori singoli, completamente indipendenti, con sorgente di vuoto esterna centralizzata. I sensori dimensionano le particelle di due canali di misura: 0.5 e 5 micron (vedi fig. 3).

Per determinare il numero di particelle, i sensori utilizzano la tecnologia di diffusione della luce prodotta quando la sorgente luminosa, costituita da un laser a diodi, impatta con una particella.

La quantità di luce diffusa è rilevata da opportuni sistemi elettronici che la trasformano in valore di tensione, direttamente proporzionale alla grandezza della particella che l'ha prodotta. Comparatori di tensione collocano la particella rilevata nel rispettivo canale di misura.

Il sistema di aspirazione esterno centralizzato garantisce una portata di 28,3 l/min; l'uniformità del valore di portata è garantito da un orifizio calibrato all'interno dello strumento. I segnali sono raccolti da uno specifico software che regi-

Fig. 3

Sonda per monitoraggio



stra i conteggi misurati, controlla che rientrino nelle soglie prefissate e, in caso contrario, genera allarmi.

Per il campionamento microbiologico il sistema è integrato da 4 piastre di campionamento in acciaio inox (dotate di tappo di chiusura da utilizzare durante le operazioni di pulizia dell'area), direttamente collegate ad un sistema centrale di aspirazione che garantisce una portata costante e permette una gestione indipendente delle diverse linee di campionamento (vedi Fig. 3).

Il flusso di aspirazione di 28,3 l/min forza l'aria aspirata in un tragitto tortuoso, garantendo un'efficienza di impatto del 95% per particelle da 0,5 micron e maggiori.

Le misure ritornate dagli strumenti si riferiscono al piede cubo; il software calcola i valori cumulativi convertendoli al metro cubo, sommando 36 campioni successivi. E' possibile utilizzare una modalità a somma mobile, aggiornata al minuto (una volta memorizzati i primi 36 campioni) con eliminazione della misura più vecchia ed aggiornamento con la nuova, oppure con un aggiornamento delle misure ogni ora, basandosi sugli ultimi 36 campioni misurati.

L'identificazione dei punti critici da monitorare in continuo è stata effettuata considerando la criticità dei processi (in particolare per le zone a rischio di diffusione di particolato, come quelle di taglio) ed il grado di esposizione del prodotto.

Sono stati individuati: un punto per ogni classe A (cappe biohazard ed aree a flusso unidirezionale) ed uno per ogni circostante area di classe B nei quali effettuare le rilevazioni *in continuo*.

Il sistema rileva anche altri parametri critici quali la temperatura e l'umidità relativa di ambienti e incubatori a CO₂ ed il delta di pressione tra laboratori di classe A e B e l'area a classe C.

Altre differenze pressorie tra diversi locali sono rilevate da manometri, "letti" quotidianamente.

Gli accessi dell'area classificata sono controllati tramite sistema a badge, così come quelli del magazzino e del locale dedicato alla criogenia.

Vengono eseguiti ulteriori rilievi particellari (dalla ditta costruttrice) e microbiologici semestrali (dalla BTM stessa, tramite campionatore RCS), sia at rest che in operation.

Sono eseguiti controlli microbiologici con tamponi, piastre da contatto e da sedimentazione su ambienti, prodotti, apparecchiature a seconda della fase di processazione di un lotto.

Quando possibile, lo stesso prodotto viene controllato in modo sistematico, tramite colture di frammenti bioptici e/o tamponi e ricerche di germi aerobici, anaerobici e miceti.

Il personale viene controllato a fine attività con l'impronta dei guanti.

Ogni positività colturale in cleanroom viene registrata su file excel e viene condotta una valutazione del trend.

È stato elaborato un documento di gestione del rischio, che definisce comportamenti e trattamenti del prodotto, in relazione alle problematiche rilevate.

Campionamento microbiologico

Vediamo ora quelle che sono le specifiche che deve avere un sistema per il controllo e la supervisione di unità per il campionamento microbiologico, facendo riferimento all'attuale documentazione di riferimento (GAMP 4: Guide for validation of Automated Systems e 21 CFR Part 11: electronic record; electronic Signature).

Le colture, poste sulle unità di campionamento (UC), devono essere attraversate dall'aria degli ambienti controllati per un tempo determinato per poi essere successivamente analizzate in laboratorio.

Per ogni UC si possono configurare segnali di allarme in grado di individuare eventuali intasamenti della piastra o situazioni di sovra-pressione. Tali anomalie vengono rilevate da un misuratore differenziale di pressione. Sono previste 2 soglie (H - alta, L - bassa) il cui superamento determina una condizione di allarme non bloccante. Nel caso invece di soglia LL (bassissima) si determina invece l'interruzione del campionamento.

Il sistema di controllo e supervisione ha il compito di gestire le UC secondo modalità programmabili in fase di attivazione, controllare il processo (evidenziando eventuali allarmi) e registrare i dati richiesti per attestare la corretta esecuzione delle operazioni eseguite.

Il sistema è composto da:

- **1 unità PLC:** per eseguire le logiche di controllo, l'acquisizione dei dati e la gestione dei collettori;
- **1 unità PC SCADA:** per permettere la programmazione dei punti di campionamento e per gestire la raccolta dei dati e la stampa dei relativi report.

Le funzionalità base relative al campionamento microbiologico possono essere raggruppate nei seguenti punti:

- gestione UC
- monitoraggio sistema
- gestione dati

Il sistema di campionamento microbiologico è un insieme di UC e ciascuna UC è composta da una parte hardware e da una software, richieste per la gestione di n.1 punto di analisi microbiologico. La parte hardware si compone di:

- n.1 piastra di campionamento

- n.1 una valvola per la connessione della piastra al collettore di aspirazione
- n.1 un rilevatore differenziale di pressione per controllare il flusso. Il rilevatore di pressione fornisce un valore analogico 4-20 mAmp (-1,0 +1,0 bar).

La parte software realizza la fase di controllo che gestisce la UC. Per ognuna UC si ha:

- **la configurazione:** permette di definire e di gestire ogni UC (Le UC non configurate non vengono visualizzate e non possono essere utilizzate). La configurazione è gestita tramite una pagina dedicata, accessibile dagli utenti aventi il diritto per farlo.
- **la gestione campionamenti:** fase di controllo che gestisce le operazioni di campionamento di una UC.

Le modalità di funzionamento previste sono di tipo

- **immediato:** l'operatore definisce la durata del campionamento, i dati identificativi ed abilita la fase. La partenza effettiva del campionamento avviene successivamente al comando di START. Una volta trascorso il tempo impostato, il campionamento termina in modo automatico (senza la presenza di allarme).
- **a orologio:** l'operatore può definire per ogni giorno della settimana i campionamenti. Per ognuno stabilisce l'ora di attivazione e la durata. La fase di controllo, una volta eseguiti tutti i campionamenti (senza allarmi) programmati, passa in Terminata.

I dati legati alle operazioni eseguite possono essere suddivisi in n.2 categorie:

- **dati di FASE:** sono quelli registrati al momento della sua attivazione. Possono contenere anche un campo descrittivo.
- **dati di Campionamento:** sono i messaggi generati quando si attiva/termina un campionamento ed ogni qual volta si rileva un allarme relativo al campionamento in corso. Sono memorizzati (tramite buffer Circolare) in modo tale da non perderli anche nel caso di fuori servizio del PC SCADA. Vengono cancellati solo nel momento in cui si ha la sicurezza che il PC ha eseguito la loro registrazione con successo. Si utilizza un protocollo di comunicazione basato su contatori di sincronismo.

Il PC registra tutti i dati in DB relazionale e permette l'estrazione del report di campionamento con tutte le informazioni che lo identificano, durate ed allarmi.

Tutti i dati vengono registrati e sono previste procedure di backup, archiviazione e ripristino. Gli accessi al sistema sono configurabili e solo gli operatori autorizzati possono accedere al sistema e svolgere esclusivamente le funzionalità per le quali sono abilitati.

Circa gli allarmi, ne sono previsti di tre tipo:

- **stato:** indica se l'allarme è correntemente presente
- **memoria:** viene attivato quando si presenta un allarme (viene resettato quando l'allarme non è presente e viene riconosciuto)
- **ack:** è il bit che indica che l'allarme è stato riconosciuto (viene resettato quando l'allarme non presente, viene riconosciuto).

Conclusione

In ambito ortopedico, è iniziata l'era dell' "Orthobiologia", scienza che combina conoscenze di biotecnologia, tecnologia dei materiali e biologia dei tessuti per ottenere la rigenerazione di osso, tessuti molli e cartilagine.

Lo sviluppo della medicina rigenerativa nelle sue varie diramazioni scientifiche richiederà la diffusione di ambienti a contaminazione controllata, con conseguente approfondimento della cultura di Buona Fabbricazione anche nell'ambito del non profit.

Le normative si svilupperanno, presumibilmente, in modo coerente alle peculiarità espresse da un settore in crescita e in modo sempre più uniforme in ambito europeo.

La tecnologia verrà incontro alle esigenze delle produzioni su piccola scala.

Il forte investimento di risorse sarà possibile sperimentando, a livello regionale, modalità di collaborazione a network tra soggetti pubblici, enti di ricerca, aziende private.

L'integrazione e le sinergie tra diverse professionalità consentirà di sviluppare la ricerca di base, preclinica e clinica, fornendo prodotti efficaci per la medicina rigenerativa, mettendo a punto brevetti innovativi e concorrenziali.

L'impegno prioritario dovrà essere sempre la salute pubblica e il miglioramento della qualità della vita, senza alcuna concessione ad obiettivi esclusivamente economici, realizzabili indirettamente attraverso i risparmi che le soluzioni tecnologicamente avanzate comporteranno nel medio termine.

Summary

Per ulteriori informazioni segnare sull'apposito tagliando il n. ...