

	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	1 di 14

LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI

Approvate dal Centro Nazionale Trapianti, novembre 2014

 <p>Centro Nazionale Trapianti</p>	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	Codifica	LG Sala Criobiologica
		Revisione	00
		Data	06/11/2014
		Pagina	2 di 14

INDICE

- 1. Scopo e ambito di applicazione**
- 2. Generalità**
- 3. Definizioni**
- 4. Requisiti strutturali di una sala criobiologica**
 - 4.1. Identificazione e caratteristiche dei locali**
 - 4.2. Porta/porte di accesso**
 - 4.3. Pavimentazione e rivestimenti**
- 5. Requisiti impiantistici di una sala criobiologica**
 - 5.1. Impiantistica di sicurezza**
 - 5.1.1. Controllo accessi**
 - 5.1.2. Impianto di videosorveglianza e rilevazioni presenze**
 - 5.1.3. Rilevazione ossigeno**
 - 5.1.4. Ventilazione e bonifica ambientale**
 - 5.1.5. Segnaletica di sicurezza**
 - 5.1.6. Impianti rilevazione fumi**
 - 5.2. Impianto elettrico e di illuminazione**
- 6. Caratteristiche tecnologiche di una sala criobiologica**
 - 6.1. Impianto di stoccaggio ed alimentazione**
 - 6.1.1. Serbatoio di stoccaggio e rifornimento azoto**
 - 6.1.2. Impianto di distribuzione dell'azoto liquido**
- 7. Strumentazione di una sala criobiologica**
 - 7.1. Contenitori criobiologici**
 - 7.1.1. Caratteristiche dei contenitori per lo stoccaggio dei campioni**
 - 7.1.2. Riempimento manuale dei contenitori criobiologici**
 - 7.1.3. Movimentazione dei contenitori criogenici**
- 8. Verifiche periodiche su recipienti e impianti**
- 9. I Dispositivi di Protezione Individuale**
- 10. Norme di comportamento**
 - 10.1.1. Norme comportamentali generali da adottare in una sala criobiologica**
 - 10.1.2. Norme specifiche da adottare in una sala criobiologica**
- 11. Procedure di emergenza**
- 12. Informazione e formazione**
- 13. Responsabilità nei confronti di terzi**
- 14. Leggi e norme**

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	3 di 14

1. Scopo e ambito di applicazione

Le presenti Linee Guida hanno lo scopo di definire le caratteristiche organizzative, strutturali e tecnologiche di una sala criobiologica deputata alla conservazione a breve, medio e lungo termine di tessuti e cellule sottoposti a congelamento e finalizzate all'uso clinico.

Le disposizioni descritte nelle presenti Linee Guida si applicano sia alle sale criobiologiche presenti all'interno di un istituto dei tessuti, come definito nel DLgs. 191/2007 che a strutture, pubbliche o private, che svolgono attività di conservazione come parte terza di un istituto dei tessuti, in base all'art. 24 del DLgs. 191/2007.

2. Generalità

Una sala criobiologica o criogenica è una struttura progettata e realizzata per la conservazione alle basse temperature, generalmente mediante l'utilizzo di fluidi criogenici, di materiale biologico finalizzato all'uso clinico.

Una sala criobiologica deve disporre di locali idonei e dedicati, con caratteristiche adeguate alle specifiche funzioni. La strumentazione in essa utilizzata deve essere adeguata all'attività svolta e conforme alle normative vigenti sulla sicurezza. Il personale deve essere qualificato e dedicato, con una formazione specifica alle funzioni da svolgere e deve essere identificato un Responsabile con esperienza nella gestione di una sala criobiologica. Tale ruolo potrà essere coperto dal Responsabile dell'istituto dei Tessuti qualora la sala criobiologica sia parte funzionale dell'Istituto stesso. Devono essere predisposte procedure operative standard, inserite all'interno del sistema qualità dell'istituto dei tessuti, per tutte le attività collegate alla sala criobiologica.

Tutto ciò deve garantire:

- ✓ la sicurezza dei lavoratori addetti;
- ✓ la sicurezza del materiale conservato;
- ✓ la sicurezza dei dati clinici, biologici e di identificazione/rintracciabilità.

Le presenti indicazioni sono da ritenersi applicabili alle sale criobiologiche di nuova costruzione. Per quelle già operative all'entrata in vigore di tali disposizioni, è da prevedere un tempo di adeguamento compreso tra i 12 e 24 mesi, che verrà valutato dalle Autorità Competenti regionali e nazionali di riferimento all'interno delle verifiche periodiche o nell'ambito di specifici controlli.

3. Definizioni

- **azoto (N₂):** gas inerte, inodore ed incolore con punto di ebollizione a 77,35 K (-195,8 °C);
- **fluido criogenico:** fluido che a pressione atmosferica bolle a temperature inferiori a -73°C;
- **azoto liquido:** azoto ridotto allo stato liquido per compressione con una temperatura di circa -196°C. Fa parte dei fluidi criogenici;
- **serbatoio di stoccaggio azoto liquido:** serbatoio criogenico, completo degli accessori previsti dalle pertinenti normative, costituito da due recipienti uno interno e uno esterno, separati da un'intercapedine isolante normalmente sottovuoto. Il

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	Codifica	LG Sala Criobiologica
		Revisione	00
		Data	06/11/2014
		Pagina	4 di 14

serbatoio criogenico, normalmente collocato in un idoneo ambiente esterno, fornisce l'azoto liquido al sistema ed è il punto di consegna dell'azienda fornitrice di gas. Un solo serbatoio criogenico può servire più contenitori criobiologici in più locali;

- **contenitore criogenico:** contenitore di dimensioni variabili contenente azoto in fase liquida, si distinguono contenitori pressurizzati e non pressurizzati;
- **contenitore criobiologico:** contenitore non pressurizzato di dimensioni variabili per la conservazione in azoto a breve/medio/lungo termine di campioni biologici. Si distinguono contenitori criobiologici a riempimento automatico e a riempimento manuale;
- **congelatore a discesa programmabile:** dispositivo utilizzato per il congelamento programmato di materiale biologico. Il sistema deve essere dotato di marcatura CE ai fini della Direttiva 93/42 CEE relativa ai dispositivi medici;
- **dispositivo di Protezione Individuale (DPI):** si intende qualsiasi attrezzatura destinata ad essere indossata e tenuta dal lavoratore allo scopo di proteggerlo contro uno o più rischi presenti nell'attività lavorativa, suscettibili di minacciarne la sicurezza o la salute durante il lavoro, nonché ogni complemento o accessorio destinato a tale scopo (*cf. art. 74, D.Lgs. 81/08 e s. m. ed i.*);
- **autorespiratore ad aria:** dispositivo per la respirazione a riserva d'aria in caso di ipossigenazione;
- **rilevatori ambientali di ossigeno (sonde):** dispositivi per il monitoraggio in continuo della percentuale di ossigeno atmosferico all'interno della sala criobiologica, collegati ad un sistema di allarme in grado di segnalare situazioni di sottossigenazione;
- **sistema di trattamento aeraulico dell'aria:** insieme di tutte le apparecchiature, le strutture, gli accessori e i controlli deputati a garantire la qualità dell'aria mantenendo specifiche condizioni microclimatiche. Rientrano nella definizione gli impianti di condizionamento/climatizzazione, di termoventilazione e di ventilazione;
- **impianto di distribuzione di azoto liquido/linea criogenica:** sistema di trasferimento dell'azoto che permette il trasferimento a distanza del fluido criogenico liquefatto. La linea è costituita da un sistema di tubazioni che collegano il serbatoio criogenico al contenitore criobiologico e può essere non isolata, coibentata o isolata sotto vuoto. La tubazione comprende tutte le valvole, i raccordi e gli strumenti di controllo necessari;
- **valvola di sicurezza:** dispositivo automatico la cui funzione è quella di impedire che la pressione di un impianto, contenente liquidi o gas, possa superare un determinato valore di taratura e/o di sicurezza.
- **dischi di rottura:** dispositivo di sicurezza montato su recipienti in pressione la cui funzione è quella di impedire che gli stessi possano esplodere o danneggiarsi a causa di un aumento di pressione in un tempo relativamente breve.

4. Requisiti strutturali di una sala criobiologica

Di seguito sono riportati i requisiti minimi strutturali di una sala criobiologica.

 <p>Centro Nazionale Trapianti</p>	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	
	Codifica	LG Sala Criobiologica
	Revisione	00
	Data	06/11/2014
	Pagina	5 di 14

4.1. Identificazione e caratteristiche dei locali

La sala criobiologica deve essere di dimensioni adeguate ed avere una collocazione appropriata e designata allo scopo specifico per il quale verrà utilizzata. Non è consigliabile per gestire e stoccare azoto liquido in volume locale di dimensioni inferiori a 20 m³.

Devono essere presenti spazi sufficienti per la movimentazione dei contenitori di azoto, dei campioni e del personale: è consigliabile che lo spazio di manovra sia pari almeno alle dimensioni del contenitore criogenico più grande.

La distanza tra i contenitori di azoto e le pareti della sala, non deve essere inferiore a 30 cm e la distanza tra i contenitori di azoto non inferiore a 20 cm.

E'consigliabile inoltre un'altezza dei locali (netta) non inferiore a 2,70 m; in tutti i casi, soprattutto se l'altezza è inferiore a quella consigliata, dovranno essere predisposti adeguati sistemi di ventilazione in grado di mantenere la percentuale di ossigeno ai livelli di sicurezza stabiliti.

La sala deve essere isolata fisicamente da altri locali o luoghi di lavoro e non deve essere utilizzata come passaggio per accedere ad altro locale.

La sala deve essere asciutta, fresca, ben ventilata e priva di sorgenti di calore.

Deve essere possibile visionare l'interno della sala criobiologica attraverso una visiva posizionata sulla porta di accesso o altra modalità di visione (es. pareti con vetrate).

Non devono essere effettuate altre lavorazioni al di fuori di quelle previste per la gestione dell'azoto liquido e del suo uso, né la sala deve essere utilizzata come deposito di altro materiale; può essere tuttavia consentito di utilizzare il locale per il posizionamento di congelatori con back up a CO₂ o azoto e per il congelamento di campioni biologici con congelatori a discesa programmata.

4.2. Porta/porte di accesso

L'accesso alla sala criobiologica deve avvenire attraverso una porta di accesso la cui dimensione della luce netta deve essere maggiore delle dimensioni del più grande dei contenitori in essa contenuto. Devono essere previsti dispositivi per impedire lo spandimento del gas in fase liquida o gassosa all'esterno attraverso la porta di accesso, che deve inoltre essere provvista di apertura verso l'esterno attraverso una barra antipanico per consentire l'evacuazione rapida del personale.

Se la sala dispone di un'altra apertura di accesso deve anch'essa avere le stesse caratteristiche.

La porta di accesso non deve essere dotata di un dispositivo di chiusura a molla. Generalmente sulla porta di accesso è presente una visiva costituita da materiale di sicurezza, che consente la visione del locale dall'esterno, ove non siano presenti altri sistemi che permettano la visione all'interno (es. pareti trasparenti).

4.3. Pavimentazione e rivestimenti

La sala deve essere dotata di pavimenti e rivestimenti (almeno fino ad un'altezza di 1,80), con caratteristiche di impermeabilità e facilmente sanificabili. Il pavimento e il rivestimento devono essere tra loro raccordati in modo tale da evitare accumuli di sporco e polvere e devono essere ricoperti con un materiale resistente alle basse temperature, con

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	Codifica	LG Sala Criobiologica
		Revisione	00
		Data	06/11/2014
		Pagina	6 di 14

facilità di manutenzione. Il pavimento deve essere rivestito di materiale resistente a carichi pesanti e non deve permettere versamenti in fogne o in reti tecniche.

5. Requisiti impiantistici di una sala criobiologica

5.1. Impiantistica di sicurezza

5.1.1. Controllo accessi

L'accesso alla sala criobiologica deve essere controllato e limitato esclusivamente al personale autorizzato. La sala criobiologica, deve essere dotata di un sistema per il monitoraggio (manuale o automatico) degli accessi al locale ed è raccomandata la registrazione dello storico degli stessi. Devono comunque essere disponibili procedure scritte nelle quali vengano definite le modalità e le condizioni per l'accesso ai locali, sotto la responsabilità del Responsabile. E' consigliabile recarsi presso la sala criobiologica accompagnati da almeno un'altra persona che resti al di fuori e che possa intervenire in caso di necessità. Ove tale precauzione non sia applicabile, è necessario mettere in atto soluzioni alternative che garantiscano la sicurezza degli operatori. All'esterno della sala criogenica deve essere presente un kit di emergenza costituito da: autorespiratore, preferibilmente a due vie (da valutare anche in base alla valutazione del rischio), guanti criogenici, grembiule criogenico, visiera o occhiali di protezione ed eventualmente sovrascarpe criogeniche. Questi dispositivi sono collocati in un'area appositamente identificata. Questi dispositivi devono essere mantenuti e controllati periodicamente secondo le indicazioni della ditta fornitrice.

5.1.2. Impianto di videosorveglianza e rilevazioni presenze

E' raccomandata l'installazione di un sistema di monitoraggio a video ed i monitor devono essere installati in aree presidiate. Qualora, in base alla valutazione del rischio, un sistema di monitoraggio a video fosse ritenuto eccessivo, è necessario predisporre modalità di accesso e procedure che prevengano il rischio di emergenze sanitarie legate alla sottossigenazione della sala criogenica.

5.1.3. Rilevazione ossigeno

Nella sala devono essere presenti rilevatori ambientali di ossigeno (sonde) che monitorano in continuo la concentrazione di ossigeno all'interno del locale. Questi rilevatori devono essere posti ad un'altezza non superiore a 1,5 m ed in ogni caso, ad una altezza inferiore alle vie respiratorie del personale autorizzato. Questi rilevatori, tarati secondo piano di manutenzione indicato dal produttore, devono essere situati nelle zone meno ventilate, vicino ai punti di passaggio, lontano da fonti di vapore e dalle prese di estrazione d'aria; la centralina di rilevazione deve permettere la visualizzazione dei valori e della concentrazione di ossigeno rilevato dal sensore o dai sensori e deve essere posizionata all'esterno della sala, nelle immediate vicinanze dell'ingresso in modo tale che il controllo avvenga in area sicura. E' indispensabile che siano installati un numero adeguato di rilevatori, definiti a seconda della configurazione e del volume della sala e in base alla tipologia e alle caratteristiche del sensore. Si raccomanda di installare almeno un rilevatore per ogni 50 m³. I rilevatori devono essere conformi alla norma vigente in materia e sottoposti a periodica manutenzione in base alle indicazioni della ditta fornitrice.

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	7 di 14

Il sistema deve prevedere almeno due soglie di allarme, una alla concentrazione di ossigeno del 19%, l'altra al 18%. Se la percentuale di ossigeno rilevata scende al di sotto di queste soglie il sistema deve prevedere l'attivazione di un allarme ottico-acustico sia all'interno del locale sia all'esterno.

L'allarme, inoltre, deve attivare un sistema di ventilazione forzata dell'ambiente e, al raggiungimento della soglia del 18% di ossigeno, dovrebbe comportare anche la chiusura della valvola di radice della linea sottovuoto, ove presente e l'interruzione del rifornimento di azoto in caso di un sistema di riempimento automatico. Il sistema di ventilazione forzata deve poter essere avviato anche manualmente dall'operatore.

Deve essere prevista una ripetizione dell'allarme (remotizzazione), almeno per la seconda soglia di allarme, o in un luogo presidiato 24 ore su 24 (ad es.: centrale operativa) che consenta di avvertire il personale addetto ed eventualmente i servizi di emergenza e/o di assistenza sanitaria o direttamente presso gli operatori. I sistemi di allarme acustico e visivo, il funzionamento delle sonde e della ventilazione forzata devono essere posti a monitoraggio periodico.

Deve essere predisposto un sistema di monitoraggio, manuale o informatizzato, dei livelli di azoto e di temperatura di ogni contenitore, in base ad una procedura o istruzione operativa definita. La registrazione di questi monitoraggi deve essere disponibile.

5.1.4. Ventilazione e bonifica ambientale

La sala criobiologica deve essere dotata di un sistema di trattamento dell'aria per il mantenimento dei valori di temperatura ed umidità e di un sistema di ventilazione di sicurezza attraverso un impianto di immissione e di estrazione dell'aria autonomo che dovrà assicurare un adeguato ricambio di aria dell'ambiente per evitare l'accumulo di azoto.

I range di riferimento della temperatura e dell'umidità devono essere compresi rispettivamente tra i 18 ed i 25°C per evitare la condensazione sulle parti più fredde dell'impianto criogenico e deposizione di ghiaccio all'interno dei serbatoi di stoccaggio e i 45-50% ± 5%, in base anche al periodo stagionale.

Il sistema di ventilazione deve essere del tipo "a tutta aria esterna", quindi senza ricircolo dell'aria prelevata dall'ambiente, e deve assicurare almeno 6 ricambi/ora in condizioni normali ed un ricambio ottimale di 25 ricambi/ora, comunque non inferiore a 20, in caso di allarme per rilevazione di una condizione di sotto ossigenazione. In caso di locali criobiologici inseriti in aree a contaminazione ambientale controllata, è necessario che l'aria esterna immessa sia prima filtrata, qualora non siano mantenute le caratteristiche di classificazione ambientali richieste.

E' di fondamentale importanza che l'immissione dell'aria avvenga dall'alto mentre l'estrazione avvenga dal basso. La griglia di estrazione dell'aria deve essere posizionata preferibilmente a 10-15 cm di altezza dal pavimento. La meccanica dell'impianto deve essere posizionata in modo tale da evitare che essa si congeli in caso di anomala fuoriuscita di azoto.

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	8 di 14

5.1.5. Segnaletica di sicurezza

La sala criobiologica deve essere circonscritta e delimitata da segnaletica di sicurezza, di prescrizione, di avvertimento e di divieto di accesso alle persone non autorizzate, previsti dalla normativa vigente, poste in posizione ben visibile (sulla porta di accesso deve essere posizionato un cartello di pericolo generico, affiancato da cartello di pericolo specifico, esempio: cartello di obbligo di indossare dispositivi di protezione individuale, cartello di avvertimento: “In caso di attivazione dell’allarme ottico-acustico lasciare immediatamente il locale e chiudere la porta di accesso”, cartello di prescrizione: “All’interno di questo locale possono essere effettuate solo le operazioni di congelamento, di deposito nei contenitori criogenici del materiale da conservare e di prelievo del materiale dal contenitore”, cartello di rischio biologico).

5.1.6. Impianti rilevazione fumi

Deve essere disponibile un impianto di rilevamento incendio in grado di rilevare e segnalare la presenza di un incendio all’interno della sala. Un dispositivo di rilevamento fumi e incendi è tipicamente costituito da apparecchiature elettroniche che rilevano la presenza di fumi o di variazioni di calore o di principio di incendio. L’allarme anti incendio deve essere remotizzato e presidiato h 24.

5.2. Impianto elettrico e di illuminazione

L’illuminazione naturale ed artificiale deve essere realizzata secondo i dettami del punto 1.10 dell’allegato IV del D.Lgs. 81/08 e s. m. ed i; deve essere inoltre conforme alle norme tecniche in materia.

Un interruttore esterno deve permettere l’accensione dell’illuminazione artificiale interna al locale.

L’alimentazione delle varie apparecchiature presenti nella sala criobiologica deve essere assicurata, adottando uno o più quadri elettrici generali, posti all’esterno della sala, dotati di un numero sufficiente di linee elettriche idonee a garantire la presenza di:

- ✓ linea per illuminazione;
- ✓ linea per i criocontenitori e/o criocongelatori;
- ✓ linea per altri apparecchi di potenza (impianto di video sorveglianza ed altri accessori);
- ✓ linea per sistema di trattamento aria;
- ✓ linea per sistema di monitoraggio ossigeno;

La potenza dell’impianto deve essere stabilita in base alle potenze presenti nelle schede tecniche delle apparecchiature che vengono installate. Apparecchi o impianti elettrici critici presenti nella sala criobiologica dovranno essere costantemente alimentati anche in caso di interruzione dell’erogazione di corrente attraverso collegamento a gruppo elettrogeno o a gruppo statico di continuità (UPS - Uninterruptible Power Supply).

6. Caratteristiche tecnologiche di una sala criobiologica

6.1. Impianto di stoccaggio ed alimentazione

6.1.1. Serbatoio di stoccaggio e rifornimento azoto

Qualora sia necessario che il rifornimento di azoto avvenga attraverso un serbatoio criogenico di elevata capacità, è necessario predisporre di un sistema di rifornimento

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	9 di 14

automatico dell'azoto collegato ai contenitori criogenici presenti nella sala criobiologica. Le condizioni che determinano l'utilizzo di tale dispositivo possono essere dettate dalla numerosità dei contenitori criobiologici, dalle loro dimensioni, dalla loro ubicazione e dalla lontananza dal fornitore di azoto. Il serbatoio deve essere posto all'aperto, in una zona recintata e di facile accesso agli automezzi per il loro rifornimento. E' fortemente raccomandato che il serbatoio sia posizionato in una zona lontana dai normali percorsi ed opportunamente segnalato. L'accesso al serbatoio deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato. E' necessario disporre di un pulsante di arresto di emergenza, situato all'ingresso dei locali, in modo tale da interrompere automaticamente il trasferimento di azoto liquido dal serbatoio. Qualora siano presenti dei serbatoi di rifornimento pressurizzati interni alla sala criobiologica, questi devono essere posizionati in un luogo asciutto, ventilato, protetto dagli agenti atmosferici, lontano da fonti di calore, protetto da rischi di incendio. Anche se il fornitore è proprietario dei serbatoi, è essenziale che l'utilizzatore abbia un'adeguata conoscenza di ogni aspetto dell'impiego di questo impianto, ed in particolare dell'esatta sistemazione delle valvole e degli interruttori da usare qualora occorresse chiudere completamente i serbatoi in caso di emergenza.

6.1.2. Impianto di distribuzione dell'azoto liquido

Se è presente un impianto di distribuzione di azoto liquido per il rifornimento in automatico dei contenitori criobiologici, l'impianto deve prevedere un sistema di tubazioni progettato per ridurre al minimo le perdite per evaporazione.

Le tubazioni devono essere etichettate in modo da evidenziare la presenza di azoto liquido ed il verso del flusso.

All'interno della sala criobiologica devono essere previsti attacchi, sulla linea sottovuoto, comprensivi di valvola criogenica e valvola di sicurezza, convogliata all'esterno, per il collegamento dei criocongelatori.

La pressione all'utilizzo, cioè all'ingresso del contenitore criobiologico, non deve superare la pressione massima di alimentazione prevista dal produttore. La linea deve inoltre essere provvista di dispositivi di sicurezza (valvole di sicurezza o dischi di rottura) previsti dalle specifiche tecniche in materia, per evitare qualsiasi rischio di esplosione.

Nel caso di linee di distribuzione coibentate, o sottovuoto, di notevole lunghezza, è opportuno che le stesse siano dotate di una valvola di sfiato all'aperto (valvola di sfogo) in fondo alla linea con riporto all'esterno, per la rimozione di vapori di azoto durante il raffreddamento della linea stessa.

Tutte le valvole manuali utilizzate sulla linea devono essere idonee per applicazioni criogeniche.

Le linee di distribuzione non devono costituire fonte di pericolo e deve essere prevenuta la formazione di atmosfere pericolose di gas in conseguenza di perdite e rotture, che possano causare fughe, ristagni. Esse devono essere ispezionabili. All'inizio della linea deve essere previsto un sistema di by-pass con elettrovalvola. Devono essere disponibili rappresentazioni planimetriche dell'impianto, con messa in evidenza dei sistemi di intercettazione.

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	10 di 14

7. Strumentazione di una sala criobiologica

7.1. Contenitori criobiologici

I contenitori criobiologici sono delle apparecchiature in grado di conservare materiale biologico in condizioni di temperatura controllata.

7.1.1. Caratteristiche dei contenitori per lo stoccaggio dei campioni biologici

Sono disponibili varie tipologie di contenitori criobiologici. La scelta del tipo di contenitore deve essere effettuata in base alle caratteristiche del prodotto biologico da crioconservare, al numero dei campioni da conservare, alle caratteristiche della sala criobiologica e dell'impianto di rifornimento dell'azoto. Nella sala devono essere previsti un numero di contenitori criobiologici, compatibili con le caratteristiche strutturali della sala stessa e se collegati ad impianto di riempimento automatico, il numero deve essere compatibile con le specifiche di progetto della linea di distribuzione e della presenza di contenitori in serie. Devono essere utilizzati solo i dispositivi di chiusura forniti con i contenitori.

I contenitori criobiologici devono essere soggetti a controllo secondo la norma vigente in materia ed in base ad un piano di manutenzione specifico. Le caratteristiche di questi contenitori, le modalità d'uso e la loro manutenzione devono essere presenti nel manuale di uso e manutenzione di ogni singolo dispositivo.

In base alla tipologia di contenitore criobiologico, alle caratteristiche del campione e del contenitore primario in cui esso viene conservato, devono essere disponibili sistemi di stoccaggio, che permettano un'adeguata protezione e la rintracciabilità del campione durante la conservazione.

Devono essere predisposti sistemi di rilevazione e di registrazione, manuali o automatici, dei livelli di azoto e della temperatura di ogni contenitore criobiologico. In entrambi i casi tali monitoraggi devono essere continui e la memorizzazione/registrazione dei dati al massimo ogni 4 ore. La definizione dei livelli di riempimento dei contenitori e i valori della temperatura di conservazione deve essere oggetto di protocolli di validazione, per il mantenimento delle caratteristiche morfologiche, biologiche e funzionali dei campioni conservati. Devono essere predisposti dei sistemi di allarme in caso di scostamento dei valori rilevati rispetto allo standard definito.

I tank di dimensioni più ridotte e non collegati ad un impianto di rifornimento automatico sono sottoposti a controlli manuali, da definire in POS in base al volume del tank e alla frequenza di apertura. La frequenza di apertura deve garantire che i livelli di azoto siano tali da mantenere i campioni nelle condizioni idonee prefissate.

7.1.2. Riempimento manuale dei contenitori criobiologici

Nel caso in cui sia necessario effettuare un travaso o un riempimento manuale di azoto liquido, è necessario che il contenitore sia vuoto e contenere solo azoto, non acqua o altri liquidi criogenici. E' possibile utilizzare un imbuto per travasare il liquido in un contenitore di piccole dimensioni. E' raccomandabile usare un tubo di travaso per estrarre il liquido o un sistema di spillamento a pressione.

Le operazioni manuali di riempimento devono essere effettuate nella sala criogenica o comunque in locale attiguo con le stesse caratteristiche di sicurezza. Devono essere

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	11 di 14

presenti almeno due operatori. E' necessario utilizzare i DPI per prevenire il contatto dell'azoto liquido, dei tubi freddi o del gas freddo con occhi e cute.

7.1.3. Movimentazione dei contenitori criogenici

Nel caso in cui sia necessario predisporre la movimentazione all'interno della struttura di contenitori criogenici, deve essere sempre posta attenzione ai rilasci involontari ed alle emissioni sistematiche di vapori freddi dagli apparecchi, che provocano l'accumulo progressivo di gas nell'ambiente diluendo il tenore di ossigeno dell'aria. Se lo spostamento viene effettuato in ascensori o montacarichi, è necessario che i contenitori, in modo particolare per quelli di notevole capacità, siano movimentati in assenza di personale, in quanto in caso di versamento a seguito di rottura del contenitore o altri eventi, l'ambiente ristretto dell'ascensore si può saturare rapidamente del liquido trasportato creando grave pericolo per il personale. Nella movimentazione utilizzare le apposite maniglie o i carrelli a mano, non tentare di sollevare il recipiente da soli ma eventualmente farsi aiutare da un secondo operatore.

Il contenitore da trasporto deve essere provvisto di sistema di presa sicura e di apposito coperchio.

8. Verifiche periodiche su recipienti e impianti

Sono necessarie verifiche periodiche sia sui contenitori che sugli impianti, intendendosi per impianto l'insieme dei dispositivi, delle apparecchiature, delle parti fisse e mobili che consentono lo stoccaggio, il trasporto, la distribuzione e l'erogazione dell'azoto liquido, e tutti i sistemi e dispositivi di segnalazione ed allarme a questi correlati, compresi i rilevatori ambientali di ossigeno e l'impianto di ventilazione, in base ad un piano di manutenzione definito.

9. Dispositivi di Protezione Individuale

I DPI devono essere impiegati quando i rischi non possono essere evitati o sufficientemente ridotti da misure tecniche di prevenzione, da mezzi di protezione collettiva, da misure, metodi o procedimenti di riorganizzazione del lavoro.

Il personale deve utilizzare tali dispositivi, averne cura e non apportarvi modifiche, segnalando difetti o inconvenienti che dovesse eventualmente riscontrare. Per l'uso di alcuni DPI è fatto obbligo di sottoporsi a programmi di formazione e di addestramento.

Ogni DPI deve essere accompagnato dalla prevista documentazione (dichiarazione di conformità da parte del fabbricante, marcatura CE, nota informativa rilasciata dal fabbricante). La Scheda di Sicurezza dell'azoto liquido fornisce un'indicazione essenziale sui DPI che devono essere usati nella manipolazione dell'azoto liquido. Parimenti il libretto d'uso e manutenzione delle apparecchiature acquistate, specifica quali DPI occorre indossare per l'utilizzo delle stesse.

Durante tutte le operazioni in cui si può incorrere nel rischio di contatto con l'azoto liquido o vapori da esso generato è necessario indossare i seguenti DPI:

9.1. Protezione delle mani e delle braccia

Per la protezione delle mani e delle braccia si utilizzano guanti lunghi, di materiale idoneo. I guanti devono calzare in maniera ampia in modo da poterli gettare via rapidamente nel

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	Codifica	LG Sala Criobiologica
		Revisione	00
		Data	06/11/2014
		Pagina	12 di 14

caso penetrasse del liquido all'interno. Devono essere controllati prima di essere indossati e ispezionati per rilevare danni o contaminazioni (tagli, punture, punti scoloriti etc.), indossati sopra le maniche del camice, in modo che eventuali gocce di liquido non siano veicolate sotto il camice e tolti prima di ogni altra attività. Il tipo di guanti da utilizzare e le specifiche per il loro utilizzo dovrebbero essere comunque dettagliati in una procedura operativa standard.

9.2. Protezione degli occhi e del viso

Per operazioni particolarmente pericolose, che possono dar luogo a schizzi o comunque, a penetrazioni di sostanze attraverso gli occhi o la cute del viso, è indispensabile utilizzare occhiali di sicurezza muniti di appositi ripari laterali (secondo EN 166), meglio una visiera o schermo facciale che protegga l'intera faccia.

9.3. Protezione del corpo

Per precauzione portare sempre i pantaloni all'esterno di stivali o scarpe in genere, è sconsigliabile utilizzare sandali o altre calzature aperte. Per lavorazioni particolari, comprese le operazioni di rabbocco manuale, che comportano l'esposizione di tutto il corpo a temperature molto basse, si possono utilizzare grembiuli di protezione o, nei casi più problematici, tute a protezione specifica o camici. E' fortemente raccomandato l'uso di sovrascarpe criogeniche durante le operazioni di riempimento manuale, soprattutto per piccoli contenitori. Indossare tute o camici preferibilmente privi di tasche.

10. Norme di comportamento

10.1. Norme comportamentali generali da adottare in una sala criobiologica

Le attività che coinvolgono fluidi criogenici devono essere riservate solo a coloro che hanno ricevuto adeguata informazione e formazione sulle corrette procedure da osservare. Tutte le operazioni devono essere svolte secondo procedure standard codificate e condivise.

10.2. Norme specifiche da adottare in una sala criobiologica

Di seguito si riporta un elenco non esaustivo di norme comportamentali specifiche di prevenzione:

- ✓ maneggiare sempre l'azoto liquido con la massima cautela;
- ✓ tenere il contenitore aperto per il tempo più breve possibile per evitare il pericolo di condensazione e formazione di gas;
- ✓ non toccare con la pelle non protetta tubazioni e recipienti contenenti azoto liquido: pericolo di ustione della pelle;
- ✓ non rovesciare azoto liquido non utilizzato negli scarichi o sul pavimento;
- ✓ utilizzare esclusivamente acqua calda per sbloccare valvole congelate;
- ✓ indossare idonei DPI;
- ✓ raccogliere dietro la nuca i capelli lunghi;
- ✓ tenersi sempre ad una distanza sicura dall'azoto che bolle o schizza e dal gas da esso emanato;
- ✓ è consigliabile usare scarpe alte o comunque sufficientemente chiuse;
- ✓ quando si maneggiano dei liquidi in contenitori aperti, per aver cura di non versarli dentro le calzature indossare sempre pantaloni all'esterno delle calzature;

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI	Codifica	LG Sala Criobiologica
		Revisione	00
		Data	06/11/2014
		Pagina	13 di 14

- ✓ eseguire sempre lentamente le operazioni di riempimento di un recipiente o di immersione nel liquido di oggetti non raffreddati così da minimizzare ebollizione e schizzi;
- ✓ usare sempre delle tenaglie o delle pinze dalla presa sicura per immergere o estrarre oggetti immersi nel fluido criogenico, mai le mani;
- ✓ evitare di riempire i contenitori oltre il livello di sicurezza: l'eccesso di liquido aumenta il tasso di evaporazione ed il pericolo di trabocchi durante il trasporto;
- ✓ per il trasferimento di contenitori pieni utilizzare sempre mezzi appropriati (per es. carrelli) e non accompagnarli in ascensore;
- ✓ ricordare sempre che oggetti normalmente morbidi e pieghevoli a temperatura ambiente diventano estremamente duri e fragili alla temperatura di questi liquidi;
- ✓ evitare di lavorare da soli durante le attività che comportino l'uso e/o la manipolazione dell'azoto liquido;
- ✓ avvertire i colleghi prima di eseguire qualsiasi operazione particolarmente pericolosa;
- ✓ non avvicinarsi a zone ove si effettuano operazioni pericolose, se non vi è la necessità;
- ✓ rispettare la segnaletica di sicurezza presente;
- ✓ non tenere nella sala criobiologica quanto non sia strettamente necessario per lo svolgimento delle attività (ad es.: effetti personali), in particolare materiali ingombranti o facilmente combustibili;
- ✓ non utilizzare tubi per misurare il livello di azoto liquido (effetto camino).

11. Procedure di emergenza

La disponibilità di procedure operative di emergenza in funzione dei possibili eventi accidentali attesi costituisce un indispensabile sistema di protezione dai rischi associati all'utilizzo dei fluidi criogenici; tali procedure devono essere disponibili e conosciute da tutti i lavoratori.

Per prevenire situazioni di emergenza o permettere di risolvere velocemente i problemi risulta fondamentale saper riconoscere i segnali che precedono un cedimento nel sistema di contenimento. Questi possono essere:

- pressioni elevate indicate sul manometro di controllo;
- inattesa formazione di brina sul sistema di contenimento;
- scarso o anormale sfiato nel sistema di contenimento;
- allarmi indicanti bassi livelli di ossigeno nell'area di lavoro;
- rumore inusuale o assenza del normale rumore di sfiato.

I segnali tipici del rilascio di un grosso quantitativo di vapori dovuti all'evaporazione del fluido criogenico sono un aumento del rumore di fondo e la formazione di un pennacchio di nebbia bianca. In questo caso, anche se il pericolo di sottossigenazione soprattutto in locali scarsamente ventilati non è mai da trascurare, in genere l'evento dannoso più probabile è il contatto con gas o liquido a bassissima temperatura con le conseguenze in precedenza menzionate. Nel caso che il rilascio non sia di grossa entità, per esempio da un dewar di piccole dimensioni, può essere sufficiente trasportare il contenitore all'aperto e lasciare che i vapori si liberino in atmosfera.

 Centro Nazionale Trapianti	LINEE GUIDA PER LA SALA CRIOBIOLOGICA DI UN ISTITUTO DEI TESSUTI		Codifica	LG Sala Criobiologica
			Revisione	00
			Data	06/11/2014
			Pagina	14 di 14

12. Informazione e formazione

Il Responsabile del laboratorio, in collaborazione con il preposto ai fini della sicurezza (vedi D.Lgs. 81/08), ha l'obbligo di istruire adeguatamente gli operatori che afferiscono alla sala criogenica, compresi studenti, tirocinanti, borsisti, ospiti e altro personale non strutturato. L'istruzione deve essere in relazione alle attività svolte, e si propone l'obiettivo che tutti siano informati e formati su:

- ✓ i rischi riferiti al posto di lavoro ed alle mansioni;
- ✓ i possibili danni derivanti dall'utilizzo di attrezzature o sostanze pericolose senza le dovute precauzioni;
- ✓ le misure di prevenzione e protezione da attuare in ogni specifica situazione;
- ✓ le misure antincendio e vie di fuga;
- ✓ piano d'emergenza;
- ✓ come vigilare sulla corretta applicazione delle misure di prevenzione e protezione da parte di tutti i frequentatori della sala criogenica stessa.

13. Leggi e norme

La realizzazione e la gestione di un locale da adibire a deposito di materiale biologico deve rispettare principalmente le seguenti leggi di riferimento:

1. **SICUREZZA DEL PERSONALE ADDETTO**, secondo le norme attualmente vigenti ed in particolare:
 - a. D.Lgs 81/2008 - Testo Unico sulla Sicurezza sul Lavoro
 - b. Decreto n. 37/2008 – Disposizioni in materia di impianti all'interno di edifici
 - c. D.Lgs 93/2000 recepimento Direttiva 97/23/CEE (PED) sugli apparecchi a pressione.
2. **SICUREZZA DEL PRODOTTO CRIOCONSERVATO**, secondo le Norme di conservazione delle cellule per uso terapeutico ed in particolare, se applicabile al tipo di materiale biologico trattato:
 - a. D. Lgs. 191/2007
 - b. D. lgs. 16/2010

Nella progettazione e realizzazione della banca biologica, inoltre, devono essere rispettate le specifiche norme tecniche applicabili.

Si precisa che l'elenco sopra indicato è indicativo e non esaustivo di tutte le norme tecniche e leggi cogenti applicabili.