

La sicurezza microbiologica nella preparazione dei leucociti marcati: una interpretazione ragionata delle NBP.

La tecnica della radiomarcatura dei leucociti rappresenta una preziosa e spesso insostituibile fonte di informazioni per il medico nucleare. Tipiche applicazioni cliniche della scintigrafia con leucociti radiomarcati sono la diagnosi di osteomieliti, di infezioni che insorgono su protesi, infezioni muscolo-scheletriche come l'artrite settica, la ricerca di focolai settici nelle febbri di origine ignota, le infezioni addominali, lo studio di patologie infiammatorie croniche intestinali. La radiomarcatura dei leucociti viene eseguita usando una molecola lipofila legata ad un isotopo radioattivo, come ^{99m}Tc o ^{111}In . Nella procedura medica corrente, circa 30 ml di sangue intero vengono prelevati dal paziente in una siringa che contiene una soluzione di Acido Citrico e Destrosio come anticoagulante. Poiché tutti i componenti cellulari del sangue possono essere marcati, è necessaria una separazione dei leucociti dagli eritrociti e dalle piastrine. Dopo il prelievo, la siringa che contiene il sangue è tenuta in posizione verticale per circa 1-2 h, per promuovere la sedimentazione degli eritrociti, facilitata dall'aggiunta di idrossietilamido. Dopo che gli eritrociti sono sedimentati, i leucociti devono essere separati dalle piastrine; il plasma ricco di leucociti viene pertanto posto in provetta e centrifugato. Il "pellet" di leucociti che si forma sul fondo della provetta viene separato dal surnatante (ricco in piastrine) ed incubato col radiofarmaco; successivamente viene lavato, ri-centrifugato ed il "pellet" così ottenuto viene sospeso in plasma o in buffer biologico, per essere re-iniettato nel paziente.

La marcatura dei leucociti autologhi rientra tra le preparazioni estemporanee di radiofarmaci e ad essa si applicano tutte quelle norme descritte dalla nuova Normativa Europea in termini di GMP, NBP e SOP, per le quali si rende necessario operare in strutture con locali classificati e che debbono avvalersi di personale qualificato.

Nella preparazione dei leucociti marcati la garanzia di sterilità rappresenta un aspetto di primaria importanza. Essa non può essere assicurata ex post (saggi di sterilità), ma deve essere garantita nel corso del processo di preparazione, secondo le norme di GMP. Tutto ciò viene ovviamente garantito dall'osservanza delle NBP, dall'uso di ambienti, procedure (comprese quelle di pulizia e disinfezione), attrezzature e dispositivi appropriati.

Le NBP dei radio farmaci di cui alla GU No 168 del 21/7/2005 recitano testualmente che: *"...Le preparazioni che hanno più alto rischio microbiologico (ripartizioni asettiche, manipolazioni di prodotti sterili e preparazioni che non possono essere*

sottoposte a sterilizzazione terminale) devono avvenire con procedure asettiche all'interno di apposita cappa a flusso laminare di grado A posta in un locale di classe B, o di un isolatore che garantisca un ambiente sterile, posto in una zona di grado D". Tale norma trova una sua pratica giustificazione, tra le altre cose, nel fatto che nelle procedure classiche le preparazioni dei leucociti marcati venivano (e spesso vengono ancora) eseguite con una procedura in cui il vial che contiene il pellet di leucociti (di solito una provetta da centrifugazione) viene aperta completamente, per eliminare il siero supernatante mediante pipettamento per ben due volte. Sebbene la letteratura medica non abbia praticamente riportato effetti avversi dovuti a contaminazione batterica del preparato finale, è evidente che una tale operazione rappresenta uno stadio critico e non garantibile, nella catena di sterilità.

Classificazione dell'aria in termini di quantità di particelle presenti (EU GMP. Vol. 4 all. 1) in vigore dal 1 mar 2009

Quantità massima ammissibile di particelle/m³ pari o superiore a:

Classe	Riposo		Operatività	
	>0.5µm	> 5µm	>0.5µm	>5µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Non definita	Non definita

Fatte queste premesse, occorre dire che per isolatore cellulare (classicamente inteso) si intende una cabina ermeticamente chiusa di tipo "glove box", dove l'operatore è fisicamente separato dal prodotto e lavora tramite guanti a manicotto. L'aria entra attraverso un filtro HEPA e viene espulsa attraverso due filtri HEPA in serie. Funziona in pressione negativa ed assicura una protezione del prodotto-operatore-ambiente

Le norme e le definizioni sopra riportate nelle NBP sono di diretta derivazione delle **EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human**

and Veterinary Use Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products, che recitano testualmente:

“21. The utilization of isolator technology to minimize human interventions in processing areas may result in a significant decrease in the risk of microbiological contamination of aseptically manufactured products from the environment. There are many possible designs of isolators and transfer devices. The isolator and the background environment should be designed so that the required air quality for the respective zones can be realized. Isolators are constructed of various materials more or less prone to puncture and leakage. Transfer devices may vary from a single door to double door designs to fully sealed systems incorporating sterilization mechanisms.

22. The transfer of materials into and out of the unit is one of the greatest potential sources of contamination. In general the area inside the isolator is the local zone for high risk manipulations, although it is recognized that laminar air flow may not exist in the working zone of all such devices”.

Le stesse norme Europee, parlando delle preparazioni che non sono soggette a sterilizzazione finale, recitano anche :

“33. Handling and filling of aseptically prepared products should be done in a grade A environment with a grade B background.

34. Prior to the completion of stoppering, transfer of partially closed containers, as used in freeze drying should be done either in a grade A environment with grade B background or in sealed transfer trays in a grade B environment“.

Da queste norme, due informazioni sono esplicitamente ed immediatamente desumibili:

- 1) Secondo i su riportati punti 21 e 22, la tecnologia degli isolatori (classicamente intesi, vale a dire glove box con filtro HEPA) è considerata fondamentale per diminuire il rischio della contaminazione microbiologica; tuttavia è ben evidenziato come il trasferimento di materiale tra l'interno e l'esterno del box isolatore, costituisca la più importante sorgente potenziale di contaminazione. Tipicamente, in una procedura per la marcatura dei leucociti, tale trasferimento avviene almeno sei (!) volte (quando si introduce il materiale ed il sangue del paziente nel box; quando si porta fuori la provetta in centrifuga per la

separazione del pellet leucocitario; quando si reintroduce tale provetta nel box; quando si porta fuori la provetta in centrifuga per la seconda volta, per la separazione del pellet leucocitario marcato; quando si reintroduce tale provetta nel box per l'allontanamento del surnatante; quando si porta fuori dal box la siringa contenente i leucociti marcati, pronta per l'iniezione).

- 2) Secondo il sopra riportato punto 34 delle EU guidelines, inoltre, un sistema chiuso o sigillato (...*sealed tray*...) è considerato equivalente (o più sicuro), in termini di sicurezza microbiologica, rispetto ad un ambiente di grado A. D'altra parte, se così non fosse, si dovrebbe arrivare alla conclusione che la semplice azione di estrarre dall'interno del box dell'isolatore la provetta da centrifuga chiusa, contenente i leucociti, contravverrebbe alle NBP, in quanto, in quel momento, il preparato non è posto in un ambiente di classe A con intorno di classe B, o anche che persino il prelievo del sangue dal paziente vada eseguito in isolatore, o sotto cappa a flusso laminare!

Se quindi tale punto 34 delle su citate norme Europee è sempre da ritenersi valido, ne consegue che un sistema, kit o apparato che fosse in grado di eseguire l'intero processo all'interno di uno o più vial (di qualsivoglia natura), chiusi e/o sigillati, dovrebbe essere perfettamente equiparabile ad un ambiente di classe A.

Ne deriva quindi che un tale sistema, kit o apparato, sempre ove fosse realmente definibile come sistema chiuso e/o sigillato (e quindi in classe A, o equivalente), potrebbe, sempre secondo le su citate NBP, essere usato in un ambiente di classe B, quale tipicamente una comune cappa a flusso laminare. Se invece il sistema, kit o apparato chiuso e/o sigillato fosse equiparabile ad un isolatore, le stesse NBP consentirebbero addirittura di operare solo in classe D.

Il vantaggio ottenibile con tale soluzione è evidente, sia in termini di facilità di uso, che in termini di spesa; giova qui ricordare che un isolatore cellulare classicamente inteso (glove box filtrata) può arrivare ad avere un costo iniziale fino a 100.000 €, al quale va aggiunto il costo del mantenimento dell'apparato in condizioni di efficienza e di sterilità. Sappiamo come tutte le operazioni eseguite in un classico isolatore presentino una indubbia complicazione nell'esecuzione, un rallentamento dei tempi operativi ed una suscettibilità alla contaminazione dell'isolatore stesso, tutte difficoltà ben note a chiunque abbia operato con sistemi di glove-box. E' inoltre da sottolineare che il regime di sicurezza sostanziale di un sistema chiuso e/o sigillato, non sarebbe dissimile da quello di altre operazioni mediche, comunemente eseguite quotidianamente negli ospedali (procedure

trasfusionali in reparto, accesso al circolo venoso periferico tramite catetere fisso, plasmaferesi), che contemplano tutte l'uso di "device" chiusi e/o sigillati (sacche con accesso perforabile, valvole autosigillanti, setti perforabili). Al proposito la **PICS (Pharmaceutical Inspection Convention)/GMP Guide for blood establishment del 25-9-2007**, recita testualmente, al punto 11.6 "...in closed system processing involves the use of pre-configured multi bag systems, the only breach of the integrity of the system is during the act of blood collection, and does not require to be carried out in a classified clean room" e ancora, al punto 11.8 "Sterile connecting devices should be used in accordance with a validated procedure. The resulting weld should be checked for satisfactory alignment and the integrity validated. The use of sterile connecting devices can be regarded as closed-system processing."

Il **WHO Technical Report Series, N0 822, 1992, Annex 1** inoltre al punto 4.11 recita testualmente "...Cross contamination should be prevented by adoption of some or all of the following measures.....using "closed systems" of manufacture...".

Riferimenti bibliografici:

- Decreto leg.vo 187/2000
- NBP Radiofarmaci (GU No 168 del 21 Luglio 2005)
- Decreto leg.vo 219/2006
- FU XII (in vigore dal 31 Marzo 2009, (GU No 77 del 2 aprile 2010)
- European Commission, "EU Guideline to Good Manufacturing Practices- Medicinal products for Human and Veterinary Use", Eudralex Vol. 4
- WHO Technical Report Series, No 822, 1992, Good Manufacturing practices for biological products-Annex 1
- PIC/S GMP Guide for Blood Establishment, PE 005-3, 25 September 2007, Pharmaceutical Inspection Convention
- De Vries E, Roca M, Jamar F, Israel O, Signore A, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2010, 37:842-48, Guidelines for the labeling of leucocytes with 99mTc-HMPAO