

## **“LA GESTIONE DEGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE CLASSIFICATI”**



GIORNATA DI FORMAZIONE E ADDESTRAMENTO VALUTATORI ISO 13485 e DIR 93/42 CE  
28 Giugno 2010  
Milano

*Leonardo Gabrieli*

1

### *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

- L'argomento in oggetto è molto esteso e si presta a molteplici valutazioni, interpretazioni e discussioni
- E' maggiormente dibattuto nell'ambiente farmaceutico con norme , linee guida e prassi, generali e specifiche
- La presentazione è sviluppata con una sintesi sicuramente non esaustiva, degli elementi inerenti a :
  - *La classificazione ambientale*
  - *Le fonti di contaminazione e le modalità di controllo*
  - *Requisiti di salute, pulizia ed abbigliamento*
  - *I metodi e gli strumenti di verifica*
  - *La pulizia e la manutenzione*
  - *Documentazione di supporto*

2

### *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

*L'organizzazione ha predisposto procedure documentate che stabiliscono le prescrizioni in materia di salute, pulizia ed abbigliamento del personale e di pulizia dell'ambiente*

- *per definire , controllare e monitorare le condizioni ambientali per la produzione dei DM*
  - *che sono forniti sterili o non sterili ma che debbono essere sterilizzati prima dell'uso*
  - *nei casi in cui le condizioni microbiche , la pulizia , i controlli ambientali e le condizioni ambientali di fabbricazione sono significative*
- *per definire i requisiti di pulizia del prodotto*



3

### *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

#### ■ Riferimenti

- EEC Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products Vol IV- Annex 1 - “Manufacture of Sterile Medicinal Products” - (rev. 2009)
- ISO 14644-1 “Classification of air cleanliness” - (1999)
- ISO 14644-2 “Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1” - (2000)
- UNI EN 556-2 Requisiti per i DM che recano l’indicazione “Sterile”
- UNI EN 13824 “Trattamento asettico DM liquidi” (2005)

4

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

EudraLex  
The Rules Governing Medicinal Products in the European Union

Volume 4  
EU Guidelines to  
Good Manufacturing Practice  
Medicinal Products for Human and Veterinary Use

Annex 1  
Manufacture of Sterile Medicinal Products  
(corrected version)

Document History	
Previous version dated 30 May 2003, in operation since	September 2003
Revision to align classification table of clean rooms, to include guidance on media simulations, bioburden monitoring and capping of vials	November 2005 to December 2007
Date for coming into operation and superseding	01 March 2009 <sup>1</sup>

Please note correction on the implementation of provisions for capping of vials!

<sup>1</sup> Note: Provisions on capping of vials should be implemented by 01 March 2010.



5

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

### EU GMP - Annex 1

- Propone una classificazione appropriata per i locali (ambienti a contaminazione controllata) di produzione farmaceutica per prodotti sterili
- Introduce limiti per la contaminazione microbiologica
- Fornisce criteri di assegnazione della classe appropriata per i diversi locali di produzione, a seconda della criticità delle operazioni che vi si svolgono (Classe A, B, C, D per criticità decrescenti)

6

*“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

EU GMP – Annex 1 : “The manufacture of sterile products is subject to special requirements in order to minimize risks of microbiological contamination, and of particulate and pyrogen contamination”.

- La fabbricazione di un prodotto sterile viene, in genere, effettuata con due tipologie di processo fondamentali:
- **STERILIZZAZIONE**
- **UTILIZZO DI TECNICHE ASETTICHE**
- Quando possibile, il prodotto deve essere sterilizzato nella fase terminale della produzione per via termica.
- Nei casi in cui la sterilizzazione terminale comprometta le caratteristiche qualitative del prodotto, le ultime fasi di lavorazione devono essere condotte in condizioni asettiche.

7

*“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

EU GMP – Annex 1 : “*The manufacture of sterile products should be carried out in clean areas. Clean areas should be maintained to an appropriate cleanliness standard..*”.

*“Clean areas for the manufacture of sterile products are classified according to the required characteristics of the environment. Each manufacturing operation requires an appropriate environmental cleanliness level in the operational state in order to minimize the risks of particulate or microbial contamination of the product or materials being handled.”*

- Il livello di pulizia richiesto per la fabbricazione di un prodotto sterile, dipende dalla criticità delle operazioni di produzione, che a loro volta, sono connesse alle caratteristiche del prodotto.

8

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

EU GMP – Annex 1 : *“In order to meet “in operation” conditions these areas should be designed to reach certain specified air-cleanliness levels in the “at rest” occupancy state. The “at-rest” state is the condition where the installation is installed and operating, complete with production equipment but with no operating personnel present. The “in operation” state is the condition where the installation is functioning in the defined operating mode with the specified number of personnel working.”*

- *‘at rest’* , con istallazione completa ed operativa, con le macchine di produzione ma senza personale presente
- *‘in operation’* in presenza di uno specificato numero di persone operative.

9

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

NORMA EUROPEA	Sterilizzazione dei dispositivi medici Trattamento asettico di dispositivi medici liquidi Requisiti	UNI EN 13824
		MAGGIO 2005

- *Personale , addestramento e stato salute, vestizione*
- *Fluidi (acque , gas, vapore)*
- *Pulizia , disinfezione , sterilizzazione*
- *Monitoraggi ambientali , limiti e rapporti*
- *Simulazioni processo (media fill), Prove di sterilità*
- *Camere bianche convenzionali, strutture, flussi, impianti*
- *Isolatori, Liofilizzazione*
- *Norma e RES*

10

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

NORMA EUROPEA	Sterilizzazione dei dispositivi medici	UNI EN 556-2
	Requisiti per i dispositivi medici che recano l'indicazione "STERILE" Parte 2: Requisiti per i dispositivi medici preparati asepticamente	
		GENNAIO 2005

- *Requisiti generali per un DM preparato asepticamente*
- *Conformità*
- *Validazione*
- *Controllo*
- *Documentazione e registrazioni*

11

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

### UNI EN 13824

- *“Camera bianca : camera all'interno della quale la concentrazione delle particelle aerodisperse è controllata e che è costruita ed utilizzata in modo da minimizzare l'introduzione, la generazione e la ritenzione di particelle al suo interno, e in cui altri parametri pertinenti, per esempio la temperatura, l'umidità e la pressione , sono controllati a seconda delle necessità”*

### UNI EN 556 - 2

- *“Preparazione aseptica : manipolazione e riempimento di contenitori e dispositivi sterili o dei loro componenti, in ambiente controllato in cui l'ingresso dell'aria, dei materiali, delle attrezzature e del personale sono regolati per controllare la contaminazione microbica e di particolati a livelli accettabili”*

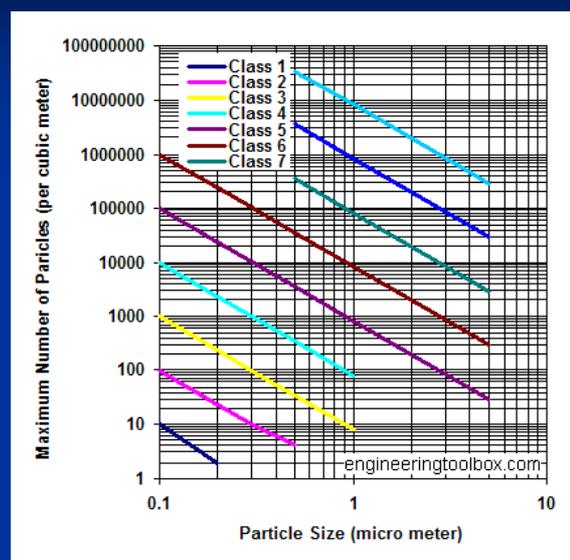
12

## *“La gestione degli ambienti di produzione classificati”*

- ISO
  - ISO-14644-1 Air Cleanliness class designations
  - ISO-14644-2 Testing for Compliance
  - ISO-14644-3 Test methods
  - ISO-14644-4 Design & Construction
  - ISO-14644-5 Cleanroom Operations
  - ISO-14644-6 Terms, Definitions & Units
  - ISO-14644-7 Minienvironments & Isolators

13

## *“Classificazione ambientale di una Clean Room”*



14

## “Classificazione ambientale di una Clean Room”

- Classi di pulizia
  - Grado A: ambienti per lavorazioni più a rischio, per i quali deve essere previsto un sistema di distribuzione di aria pulita a ‘flusso laminare’ (dimostrato e convalidato)
  - Grado B: ambienti di preparazione e riempimento in asepsi, complementari per il GRADO A.
  - Grado C/D per l’effettuazione degli stadi meno critici di fabbricazione
- *La classificazione del grado di pulizia in accordo alla EN ISO 14644-1.*

15

## “Classificazione ambientale di una Clean Room”

### Contaminazione particellare Annex 1

Grade	At rest		In operation	
	Maximum permitted number of part/mc equal to or above			
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
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	Not defined	Not defined

**Nota:** Ai fini della classificazione delle zone in grado A, il volume minimo di campione deve essere pari a 1 m<sup>3</sup> per ogni punto prelevato.

16

## “Classificazione ambientale di una Clean Room”

### Contaminazione particellare ISO 14644-1

ISO 14644-1: classi di pulizia particellare dell'aria per le sale sterili e le aree pulite

ISO Class.	Limiti di concentrazione massimi (particelle/m <sup>3</sup> d'aria) per particelle di dimensioni uguali o superiori a quelle di seguito riportate.					
	? 0.1µm	? 0.2µm	? 0.3µm	? 0.5µm	? 1.0µm	? 5.0µm
ISO Class 1	10	2				
ISO Class 2	100	24	10	4		
ISO Class 3	1,000	237	102	35	8	
ISO Class 4	10,000	2,370	1,020	352	83	
ISO Class 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
ISO Class 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
ISO Class 7				352,000	83,200	2,930
ISO Class 8				3,520,000	832,000	29,300
ISO Class 9				35,200,000	8,320,000	293,000

**Nota:** la classe ISO 5 corrisponde alla classe B EU GMP Annex 1.

17

## “Classificazione ambientale di una Clean Room”

### Contaminazione microbiologica (a) Annex 1

Grade	air sample cfu/m <sup>3</sup>	settle plates (diameter 90mm) cfu/4 hours (b)	contact plates (diameter 55 mm) cfu/plate	glove print 5 fingers cfu/glove
<b>A</b>	<1	<1	<1	<1
<b>B</b>	10	5	5	5
<b>C</b>	100	50	25	-
<b>D</b>	200	100	50	-

**Note:**

(a) valori medi

(b) Piastre esposte per meno di 4 ore

*Dovrebbero essere definiti dei limiti d'allerta e d'azione.*

18

## *“Classificazione ambientale di una Clean Room”*

### Annex 1

	<b><i>Asepsi</i></b>	<b><i>Sterilizzazione terminale</i></b>
<b>Grado A</b>	Preparazione e riempimento in asepsi	Riempimento di prodotti particolarmente a rischio di contaminazione
<b>Grado B</b>	Ambiente circostante le aree classe A, per preparazione e riempimento aseptico	
<b>Grado C</b>	Preparazione di soluzioni da filtrare sterilmente	Preparazione di soluzioni particolarmente a rischio di contaminazione, riempimento
<b>Grado D</b>	Manipolazione di componenti dopo il lavaggio	Preparazione di soluzioni e componenti per il riempimento successivo

## *“Classificazione ambientale di una Clean Room”*

- Classi ed operazioni
  - Produzioni aettiche
    - Manipolazioni e riempimenti aettici prodotti sterili (ambienti Grado A in zone grado B)
  - Isolatori o Tecnologie Blow / Fill / Seal
    - Sistemi chiusi (ambienti Grado C o D)
  - Sterilizzazione Finale
    - Preparazione dei componenti e dei prodotti da sterilizzare (ambienti Grado C o D)
    - Riempimento di prodotti per la sterilizzazione terminale (ambienti Grado C)
    - Prodotti a rischio di contaminazione (riempimento in ambienti Grado A in zone grado C)

## “Classificazione ambientale di una Clean Room”

Strategic Testing: (Table 1) Schedule of Tests to Demonstrate Continuing Compliance.

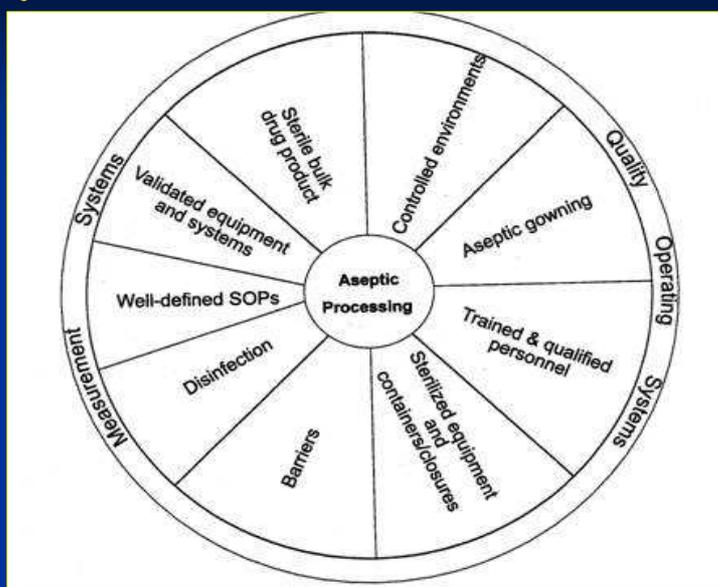
Test Parameter	Class	Maximum Time Interval	Test Procedure
Particle Count Test	< or = ISO 5	6 Months	ISO 14644-1 Annex A
	> ISO 5	12 Months	ISO 14644-1 Annex B5
Air Pressure Difference	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B4
Airflow	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B4

Strategic Testing: (Table 2) Schedule of Additional Optional Tests.

Test Parameter	Class	Maximum Time Interval	Test Procedure
Installed Filter Leakage	All Classes	24 Months	ISO 14644-3 Annex B6
Containment Leakage	All Classes	24 Months	ISO 14644-3 Annex B4
Recovery	All Classes	24 Months	ISO 14644-3 Annex B13
Airflow Visualization	All Classes	24 Months	ISO 14644-3 Annex B7

21

## “Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”



## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

La gestione degli ambienti di fabbricazione classificati, confinati, a contaminazione controllata, aree sterili, o in asepsi che dir si voglia è influenzata da una serie di elementi tra i quali i più importanti sono :

- Strutture e finiture
- Impianti di condizionamento (HVAC)
- Personale 🧑
- Indumenti
- Materie prime, prodotto, materiali
- Processo
- Stato di pulizia ed igiene

23

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Strutture

- Muratura ricoperta , prefabbricati in laminato plastico
- Aree compartimentate , produttive e ancillari
- Locali con flussi entrata e uscita distinti
- Sovrapressioni differenziate a scalare
- Spogliatoi ed ingressi multipli
- Corridoi esterni
- Aree tecniche accesso impianti esterne
- Interblocchi porte con segnalatori
- Impianti distribuzione WFI, Azoto , aria compressa

24

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Strutture

- Isolatori
- HVAC con filtri HEPA
- Impianti contaparticelle
- Impianti sterilizzazione interfacciati a doppia porta
- Pass boxes
- Laminar flow (plenum, hoods)
- Cortine guida flusso in materiale plastico
- Interfoni
- Visive a tenuta stagna (doppi vetri)

25

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Clean room, caratteristiche:

- Superfici lisce, resistenti all'abrasione
- Facilmente pulibili e disinfettabili
- Ridotto rilascio particellare nell'ambiente (materiali plastici, polimeri vinilici, epossidici)
- Assenza soluzioni di continuit , di angoli e spigoli vivi
- Assenza di scarichi in aree a classe A/B
- Tubazioni e servizi facilmente accessibili e pulibili
- Attrezzature disposte per favorire le movimentazioni
- Spazi adeguati per operativit  e mantenimento materiali
- Lampade , diffusori e riprese aria planari
- Accessi controllati ed interbloccati

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*



*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*



### *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Impianti di condizionamento (HVAC), caratteristiche

- Aria filtrata attraverso filtri a bassa porosità
- Flussi unidirezionali o laminari (paralleli) con velocità dell'aria  $0,36 \div 0,54$  m/sec
- Ricambi opportuni e definiti ( 25 - 500/H )
- Riprese adeguate (griglie) ed in posizione corretta
- Delta di pressione tra locali a classe differente
- Temperatura ed UR % adeguate al comfort ed alle caratteristiche della produzione
- Sono soggetti a qualifica (IQ,OQ,PQ)

29

### *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

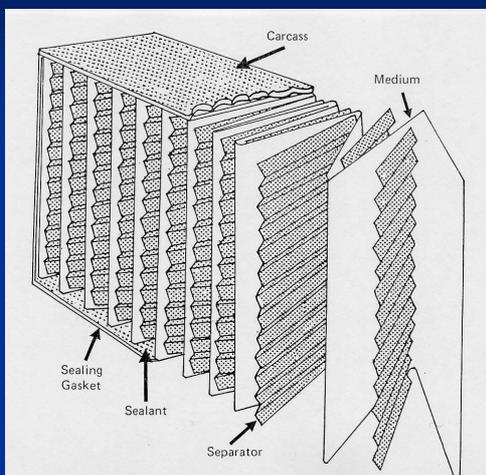
Filtrazione aria

- Filtri HEPA. Per ambienti sterili i filtri devono essere sempre terminali.

La catena di filtrazione può essere costituita:

- 1-2° stadio pre-filtri trattengono la polvere fine con un'efficienza dell'85% (EU7).
- Banco filtri principali e terminali: sono filtri HEPA con un'efficienza >99.95% (H13 – H14).
- FILTRI HEPA 99.9997% DI PARTICELLE DI  $0.3 \mu\text{m}$
- ULPA 99.99996% DI PARTICELLE DI  $0.12 \mu\text{m}$
- La loro integrità è fondamentale e viene verificata periodicamente con il test di tenuta (aerosol) e sostituiti in caso la loro efficienza si riduce

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*



I filtri HEPA sono generalmente costituiti da fogli di fibre di vetro ripiegati più volte con separatori forati di cartone o alluminio, sigillati dentro un contenitore metallico

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Distribuzione aria

- Flusso turbolento
  - zone stagnanti e turbolente (da minimizzare)
  - rimuove le particelle per un effetto di diluizione
  - classe di pulizia inferiore alla A
- Flusso laminare
  - Unidirezionale, piani paralleli alla stessa velocità dell'aria (0,36 ÷ 0,54 m/sec)
  - verticale, orizzontale, down cross
  - locali, cabine, cortine
- Delta pressione tra ambienti limitrofi :10 -15 Pa ottenuto mediante studi di gradiente , griglie e valvole

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Condizioni ambientali

Area	Prodotti	Tipo di Attività	Aria				Dispositivi		Temp	Umidità
			Flusso	Quantità	Pressione (Pa)	Qualità	locali	ricircolo		
Sterile (asettica)	Sterili Iniettabili	Formulazione Riempimento	Critico		15 Pa tra aree classificate e non classificate	Grado A nelle zone critiche	LAF	>80 %	20 +/- 2 °C	35-50
				non specificata	10 Pa tra aree classificate ed aree a minore classificazione	Grado B nell'intorno				
Clean (Prodotti con sterilizzazione Terminale)	Iniettabili	Formulazione Riempimento	Critico		15 Pa tra aree classificate e non classificate	Grado C	LAF	>80 %	20 +/- 2 °C	35-50
				non specificata	10 Pa tra aree classificate ed aree a minore classificazione					

Note: i valori indicati per Ricircolo d'aria, Temperatura, Umidità sono da considerarsi consigliati e non imposti da normative

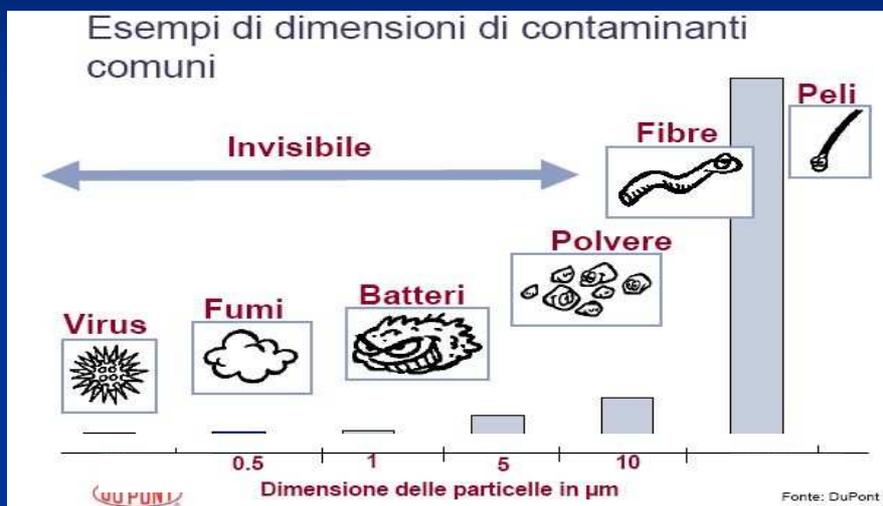
*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Contaminazione nel processo in asepsi

- Contaminazione microbiologica
- Contaminazione particellare (anche veicolo di contaminazione microbiologica)
- Contaminazione da sostanze estranee
  
- Gli elementi che devono garantire l'asepsi sono gli stessi che controllano il livello di contaminazione microbiologica del prodotto a sterilizzazione terminale.

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Particelle Vitali e Non-Vitali



35

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### ■ Microbiologia e diffusione

- I microrganismi sono presenti nell'aria e sulle superfici : batteri, funghi e protozoi, così come alcuni virus sono capaci di resistere in un mezzo esterno.
- Vengono aerotrasportati dai movimenti convettivi dell'aria sotto forma di bioaerosol, legandosi a polvere, particelle liquide o altri contaminanti naturalmente presenti, con conseguente rischio di esposizione per via inalatoria, per contatto con superfici contaminate o per ingestione.
- Nelle aree asettiche i contaminanti devono essere mantenuti sotto specifici valori in quanto risultano potenzialmente dannosi per i prodotti fabbricati

36

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Modalità di adesione



37

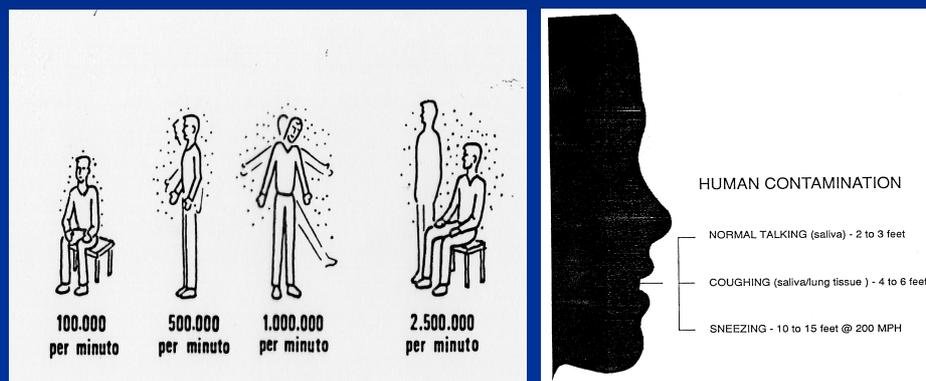
*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Proveniente dagli operatori

- microbiologica e particellare
- Cavo orale
- Naso e prime vie aeree
- Cute e cuoio capelluto

NUMERO APPROSSIMATIVO DI BATTERI PRESENTI NELLE VARIE PARTI DEL CORPO UMANO		
PELLE	cuoio capelluto	1-2 milioni/cm <sup>2</sup>
	ascelle	2-3 milioni/cm <sup>2</sup>
	avambraccio	da 100 a 5000/cm <sup>2</sup>
	schiena	300/cm <sup>2</sup>
	fronte	200.000/cm <sup>2</sup>
FECI		100 miliardi/g (10-20% del peso)
URINA		da 0 a 1000/ml
SALIVA		100 milioni/ml
NASO (secrezione nasale)		da 1 a 10 milioni/ml
ORECCHIO (cerume)		da 10 a 100 milioni/g

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*



## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Personale

- Numero minimo di operatori presente nell'area delle operazioni asettiche
- Qualifica della vestizione mediante ripetuti controlli microbiologici
- Elevato standard di igiene personale
- Controlli medici periodici ed attenzione al personale affetto da malattie (vie aeree, stomaco, pelle)
- Trucco, oggetti personali o gioielli, cibi o farmaci personali non permessi
- Procedure operative dettagliate per le attività da svolgere nelle aree classificate, con interventi regolati sulle macchine e durante il riempimento asettico

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Abbigliamento

- Idoneo e dedicato per le diverse operazioni
- Fibre continue, tessuti con fili conduttivi antistatici
- Non deve apportare contaminazione al prodotto
- Confort per gli operatori , effetto barriera,
- Indumenti sterili, lavabili e ri-sterilizzabili (vapore, radiazioni) , se non disposable
- Ridotto rilascio di particelle/fibre es poliestere, poliolefine (tyvek)
- Cuciture integre , assenza strappi

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*



*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Abbigliamento

<b>Grade</b>	Sottotute Tute Camici	Cappuccio Maschere Occhiali	Guanti	Cuffie Copribarba	Scarpe Sovrascarpe	Sterili (per ogni turno)
<b>A</b>	X	X	X		X	X
<b>B</b>	X	X	X		X	X
<b>C</b>	X		X	X	X	
<b>D</b>	X			X	X	

Procedura descrittiva con dettagli/ foto / disegni

43

*“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

Training

- GMP generale
- Norme igieniche: microbiologia di base e conoscenza della potenziale contaminazione umana
- Accesso, uscita , e comportamento in clean room
- Modalita' e sequenze di vestizione
- Lavorazioni nelle clean rooms
- Elementi del processo dove l'operatore può causare contaminazione, interventi
- Pulizia ambienti ed attrezzature
- Media fill
- Addestramento periodico , e in caso di assenze

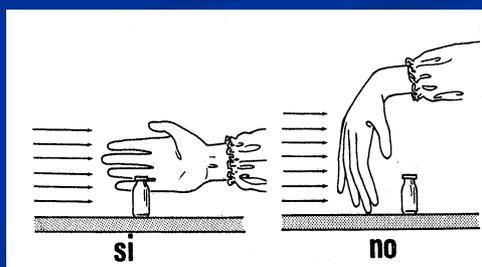
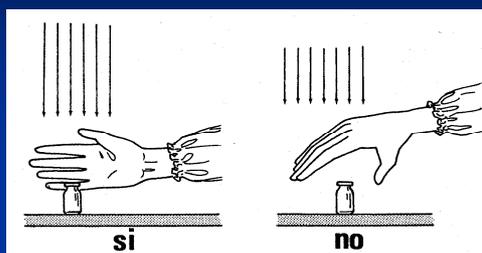
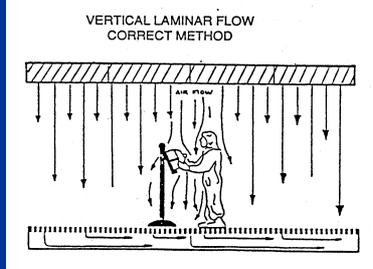
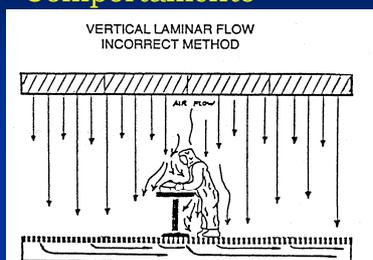
## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Comportamento

- I capelli e la barba non devono fuoriuscire dal cappuccio e la maschera deve coprire il viso
- I guanti vanno richiusi al di sopra delle maniche in modo che non ci sia pelle esposta
- Disinfettare frequentemente i guanti con disinfettante sterile, facendo attenzione a non investire il prodotto
- La posizione del corpo deve essere sempre il più possibile parallela al flusso d'aria, non interrompere o creare vortici al flusso, non bloccare le riprese
- Non interpersi e non interporre nulla tra il flusso d'aria e il prodotto o le superfici a contatto

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Comportamento



## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### Comportamento

- Muoversi lentamente, non agitarsi, non correre
- Non urlare, ridere, tossire, parlare solo il necessario
- Non toccare materiali e superfici se non necessario
- Non toccare occhiali o altre parti del vestito
- Non toccare le altre persone
- Non toccare mai il prodotto o le superfici e materiali che vengono a contatto col prodotto, se non con tools sterili.
- Non raccogliere oggetti dal pavimento, non toccare il pavimento

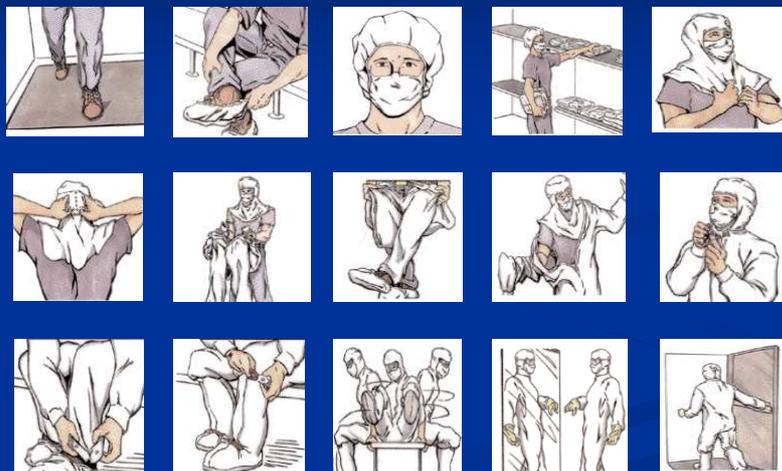
## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### ■ Procedure

- Specifiche procedure devono descrivere le modalità generali per :
  - Le condizioni igieniche e di salute del personale
  - L'accesso , la vestizione , i flussi ed il comportamento del personale che svolge attività operative (personale interno o esterno)
  - I flussi e la movimentazione dei materiali di lavorazione
  - La pulizia , disinfezione e sterilizzazione
  - I monitoraggi microbiologici e particellari (ambienti, personale e fluidi)

## *“Le fonti della contaminazione e modalità di controllo”*

### *Vestizione*



49

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

- Il monitoraggio ambientale è finalizzato alla valutazione della contaminazione particellare degli ambienti e la contaminazione microbica dell'aria, delle superfici e del personale.
- Esso deve permettere di correlare la contaminazione all'attività produttiva svolta a:
  - condizioni ambientali
  - attrezzature o macchine utilizzate, personale presente
  - orario di lavoro,
  - l'efficienza dei sistemi HVAC (portate, flussi e ricambi aria)
  - i tempi di recovery (ritorno alle condizioni stabilite)
  - eventuali misure preventive o di contenimento adottate.

50

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### Monitoraggio

- Nelle aree critiche in cui il prodotto è esposto o manipolato e nelle aree immediatamente circostanti
- Particellare: continuo o discontinuo (ma durante la attività di produzione), con contatori laser e determinazione di particelle da 5 e 0,5  $\mu\text{m}$
- Microbiologico: aria, settle plates, contact plates e swab sulle superfici durante la produzione dei lotti
- Fingers e contact plates operatori al termine delle attività
- Risultati dei monitoraggi fanno parte del batch record, e del giudizio di rilascio del lotto e raccolti per esami di trends

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### Monitoraggio

- Nelle zone classificate “A” il monitoraggio particellare deve essere continuo, mentre nell’intorno classificato “B” è raccomandato
- Le condizioni “at rest” e “in operation” si devono ottenere dopo un breve periodo di “pulizia” (funzionamento del sistema di condizionamento) stimato in 15 – 20 minuti (valore guida)
- Il grado “A in operation” è misurato nella zona intorno al prodotto o al contenitore aperto, quando questi sono esposti all’ambiente (attenzione al fenomeno della nebulizzazione durante il riempimento)

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

- Punti di prelievo
  - La definizione dei punti di campionamento e posizionamento delle sonde di controllo della contaminazione deriva dalla qualifica degli ambienti
  - I punti di prelievo vanno identificati in base alla criticità della zona di lavoro, i passaggi del personale e materiali ed in base agli studi di distribuzione dell'aria
  - Il numero di punti di prelievo dipende dalla grandezza delle aree coinvolte
  - I punti di prelievo più critici devono rientrare nel monitoraggio periodico delle aree a contaminazione controllata.

53

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

- Punti di prelievo
  - prelievi a centro-ambiente effettuati prima dell'inizio delle attività lavorative, in assenza di personale, a macchine spente e con impianti di condizionamento/ventilazione spenti
  - prelievi in corrispondenza delle bocchette interne, nel punto di ingresso dell'aria trattata, a 50 cm di distanza, in assenza di personale (prelievo “*at rest*”);
  - prelievi effettuati a centro-ambiente, con il personale presente e in attività, macchine e condizionamento in funzione. In alternativa, effettuare i prelievi a inizio e fine turno di lavoro (prelievo “*in operation*”).

54

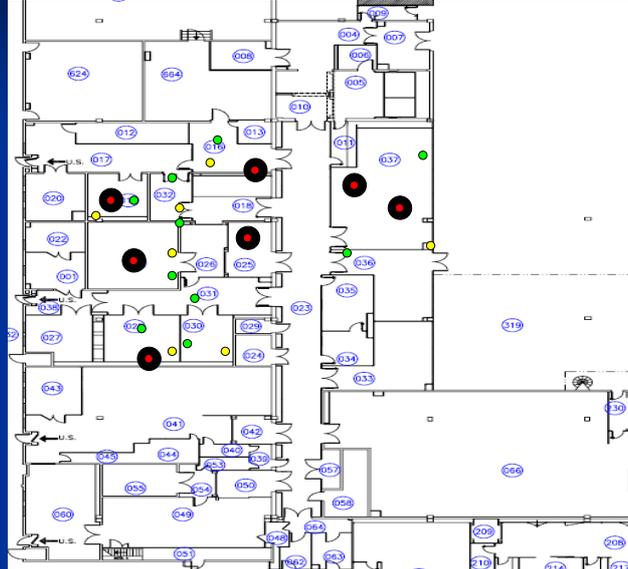
## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

Mappe

Pareti ●

Pavim ●

Aria ●



55

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Monitoraggio microbiologico

- Attuato con controlli dell'aria e delle superfici di lavoro. Le cellule microbiche sospese nell'aria o depositatisi sulle superfici vengono prelevate e fatte moltiplicare su idonei terreni di coltura, in modo da poterle poi quantificare ed eventualmente identificare.
- E' rilevata solo la frazione microbica metabolicamente attiva, in grado di riprodursi e di formare colonie visibili.
- Le tecniche di campionamento non devono causare una condizione di stress per i microrganismi stessi, compromettendone la vitalità

56

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*



57

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Aria, Campionamento Attivo

- I campionatori attivi aspirano volumi predeterminati d'aria, convogliandoli su un terreno di coltura solido. I microrganismi presenti nell'aria aderiscono al terreno e, dopo un adeguato periodo di incubazione, danno origine a colonie visibili a occhio nudo, che si possono numerare e, dopo isolamento, identificare. Il livello di contaminazione microbica si esprime come Unità Formanti Colonie (UFC) per m<sup>3</sup> di aria.
- Questo metodo di campionamento ha il vantaggio di permettere l'aspirazione di grandi volumi di aria confinata, minimizzando le differenze di distribuzione dei batteri dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi.

58

### *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

#### ■ Aria, Campionamento Attivo

- Strumenti ad impatto tangenziale : campionatore Reuter Centrifugal Sampler (RCS) aspira l'aria convogliandola su una striscia di substrato agarizzato



- Strumenti ad impatto ortogonale : Surface Air System (SAS) o Biocapt , l'aria aspirata viene inviata sulla superficie di uno specifico terreno di coltura agarizzato



59

### *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

#### ■ Aria, Campionamento Passivo

- Nel campionamento passivo si espongono nell'ambiente piastre Petri di 9 cm di diametro contenenti idoneo terreno di coltura, lasciate aperte per almeno 4 ore , ad un metro da terra e da ogni ostacolo fisico rilevante,
- Su di esse si raccolgono per sedimentazione i microrganismi veicolati da particelle sospese nell'aria. L'efficienza della raccolta dipende dalle caratteristiche aerodinamiche delle particelle e dal grado di ventilazione dell'ambiente.
- Dopo opportuna incubazione delle piastre, si procede alla conta del numero di unità formanti colonia (UFC)/m<sup>3</sup>

60

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Superfici

- Piastre petri con terreni nutritivi poste a contatto , delle pareti, pavimenti, piani, apparecchiature ed utensili di lavoro per alcuni minuti , e successivamente incubate
- Tamponi (swab) strisciati su superfici definite ,poi introdotti in soluzioni sterili successivamente filtrate ed incubate. Metodo per superfici irregolari o non planari, meno standardizzabile.
- Normalmente la singola superficie testata è di 25 cm<sup>2</sup>
- I risultati sono espressi come UFC/cm<sup>2</sup>

61

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Personale, mani guantate e corpo

- Consente la verifica dell'applicazione delle corrette procedure igieniche da parte del personale, per la prevenzione del rischio di contaminazione.
- Si attua usualmente alla uscita del personale dalle aree a contaminazione controllata
- Si utilizzano piastre Petri con terreni nutritivi apposti sulle superfici per un tempo stabilito
- Mani: si premono i polpastrelli della mano del lavoratore delicatamente sul terreno, per 10 secondi.
- Corpo: si preme delicatamente la piastra su avambracci e torace del lavoratore, per 10 secondi

62

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Considerazioni

- batteri psicrofili: indicatore ambientale, accrescimento ottimale intorno ai 25°C (range 15°-30°C) e vivono a spese della sostanza organica presente
- batteri mesofili: indicatori di origine umana, accrescimento intorno ai 37°C (range 25°-40°C), inclusi i patogeni convenzionali
- funghi (muffe e lieviti): indicatore ambientale, correlato alla presenza di elevata umidità e polverosità, ridotta ventilazione e scarsa qualità dell'aria.
- Staphylococcus spp. o Escherichia spp. Ed altri Gram negativi, in quanto produttori di endotossine.

63

## *“I metodi e gli strumenti di verifica”*

### ■ Monitoraggio particellare aria

- Campionatori laser portatili, sonde singole o multiple nei locali/punti critici
- Differenti canali di misura 0,3 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 25 micron
- Rilevazione parametri, umidità relativa, temperatura, data, tempo di campionamento, flusso volume di campionamento,
- Calcoli in automatico compresi i valori individuali, cumulativi, medie e deviazione standard
- Stampa della classe di appartenenza a fronte dello standard definito, istogrammi della distribuzione particellare



64

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Pulizia

- attività di lavaggio e/o disinfezione di tipo fisico, chimico o termico effettuate al fine di evitare qualsiasi contaminazione apportata dall'aria, apparecchiature e locali in cui le attività sono svolte
- detergenti (tensioattivi, abrasivi, candeggianti, solventi, emulsionanti ecc.) che servono per rimuovere i grassi, lo sporco o altri materiali estranei dalle superfici, attrezzature e materiali
- sanitizzanti, disinfettanti, sporicidi (solventi, ossidanti, alcoli, aldeidi, fenoli, perossidi o altri composti organici) che servono a ridurre, inattivare o distruggere, i microrganismi/spore nell'aria e sulle superfici

65

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Pulizia

- Le attrezzature per la pulizia (es. panni, spazzoloni, aste, teste) devono essere di materiale disinfettabile e/o sterilizzabile in autoclave e dedicate all'area sterile
- Le operazioni di pulizia devono interessare tutte le zone, anche quelle meno accessibili.
- Pareti, porte, finestre : iniziare dall'alto e dirigersi verso il basso con movimenti verticali;
- Pavimenti e soffitti : iniziare dal fondo del locale verso l'uscita del locale secondo strisce parallele
- Iniziare le operazioni di pulizia dalle zone più pulite verso quelle più sporche
- Analoghe condizioni per i piani di lavoro

66

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Pulizia

- La frequenza delle attività di pulizia ordinaria dei locali va definita in base alla criticità delle aree
  - es “classe B” (pavimenti, pareti e piani di lavoro frequenza giornaliera , soffitti frequenza bisettimanale)
- La pulizia straordinaria dei locali di lavorazione può essere necessaria
  - in caso di superamento dei limiti microbiologici previsti per i locali in oggetto
  - impossibilità di mantenere i flussi di pressioni differenziali richiesti

67

## *“La pulizia e la manutenzione”*



68

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Pulizia

- Tutti i materiali che vengono a contatto con il prodotto sono di norma lavati (e sterilizzati/depirogenati)
- Acqua depurata(PW , Purified water)
  - prodotta per scambio ionico, osmosi inversa
  - contaminazione microbiologica < 100 ufc/ml
- Acqua per preparazione iniettabili (WFI, water for injection)
  - prodotta per osmosi inversa , distillazione
  - contaminazione microbiologica < 10 ufc/100 ml
- Una volta lavati, puliti ed asciugati i materiali , vanno protetti in contenitori puliti (sterili) se non immediatamente sterilizzati

69

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Pulizia

- Le procedure di pulizia devono essere convalidate (Cleaning Validation)
- I materiali da trasferire all'interno delle aree sterili sono confezionati in multiplo involucro, in modo da ridurre al minimo il rischio da contaminazione durante i passaggi nei locali di classe differente
- Il personale che effettua le attività di pulizia / sanitizzazione deve essere addestrato ed a conoscenza delle procedure e norme che regolano l'ingresso, l'uscita ed il comportamento nelle aree
- Le operazioni di pulizia e sanitizzazione vengono attuate immediatamente al termine delle attività di lavorazione e sono registrate nei log books

70

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### Manutenzione

- L'intervento di manutenzione è già di per sé a rischio di contaminazione,
- Quando possibile effettuate fuori dalla clean room
- Effettuata da parte di personale addestrato
- Se non si può fare a meno di fare manovre inquinanti, concordare modalità e azioni correttive seguenti
- Modalità di intervento, smontaggio e rimontaggio, pulizia e ripristino dell'area /linea (con monitoraggi)
- Procedure di lavaggio e sanitizzazione/sterilizzazione di parti macchina e tools , e introduzione/uscita dalla clean room
- Registrazione interventi negli appositi log books

## *“La pulizia e la manutenzione”*

### ■ Disinfezione

- Le aree pulite devono essere disinfettate accuratamente in base ad un programma prestabilito
- Disinfettanti :
  - Qualificati
  - ≠ tipologie (Rotazione)
  - In zone Grado A e B devono essere sterili prima dell'uso (Sanitizzanti / Detergenti)
  - Diluiti , vanno conservati solo per periodi definiti
  - Distribuiti (aerosol) in modo da raggiungere tutte le zone interessate ed i luoghi meno accessibili
- Valutazione della comparsa di ceppi resistenti (mediante monitoraggio aree)

## “La pulizia e la manutenzione”

- Scelta dei disinfettanti
  - spettro e meccanismo d’azione
  - complementarità e alternanza
  - sicurezza per gli operatori (possibilmente, atossico e anallergico)
  - compatibilità con i materiali con cui viene a contatto
  - facilità d’applicazione e di rimozione in fase di pulizia
  - stabilità in soluzione alle concentrazioni di impiego
  - facilità di reperimento in commercio e disponibilità dei fornitori a fornire informazioni e documentazione
  - completezza documentazione di supporto (scheda tecnica, scheda di sicurezza, modalità di smaltimento, informazioni varie sul prodotto)

73

## “La pulizia e la manutenzione”

### Esempi

Disinfettante	Tipologia chimica	Uso/Classificazione
70% Alcol isopropilico 70% Alcol etilico	Alcoli	Scopi Generali Disinfettanti/Antisettici
Clorocresolo: 500 µg/g* Cloroxilenolo: 500 µg/g*	Fenoli	Scopi Generali Disinfettanti
Benzalconio cloruro: 200 µg/g*	Composti di ammonio quaternario	Scopi Generali Disinfettanti/Antisettici
Clorexidina gluconato: 0,5%*	Biguanidi Sostituti	Agenti Antisettici
Glutaraldeide: 2%*	Aldeidi	Agenti Sporicidi
Sodio ipoclorito: 0,5%	Cloro e Sodio ipoclorito	Agenti Sporicidi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> soluzione 10-25% soluzione 3%	Perossido di idrogeno	Liquido: Sporicida/Antisettico Fase Vapore: Sterilizzante
Acido peracetico 0,2%* Acido peracetico 1 µg/g*	Acido peracetico	Liquido: Sterilizzante Fase Vapore: Sterilizzante
β-propiolattone: 100 µg/g*	β-propiolattone	Agente Sporicida

\* In soluzione acquosa

### *“La pulizia e la manutenzione”*

- L'attività antimicrobica può variare a seconda del materiale da trattare popolazione microbica, i tempi di contatto, la temperatura, la concentrazione, la presenza di sostanze interferenti, quali residui di lavorazione o di altri disinfettanti precedentemente utilizzati.
  - EN 1040: attività battericida
  - EN 1275: attività fungicida
  - EN 14347: attività sporicida
  - EN 1276: attività battericida *in sospensione*
  - EN 1650: attività fungicida *in sospensione*
  - EN 13704: attività sporicida *in sospensione*
  - EN 13697: attività battericida e fungicida sulle superfici

75

### *“Trattamenti e convalide”*

- Processi di Sterilizzazione
  - Calore Umido
    - Vapore puro
    - Temperature e Pressioni
    - Bioindicatori
  - Calore Secco
    - Aria riscaldata sterile (filtro HEPA)
    - Sterilizzazione e Depirogenazione
    - Endotossine

76

## *“Trattamenti e convalide”*

- Processi di Sterilizzazione
  - Radiazioni
    - Raggi gamma
    - Per prodotti/contenitori sensibili al calore
    - Misurazione dosi radiazioni (Dosimetri)
    - Bioindicatori
  - Ossido di etilene
    - Eto
    - Pressioni/Temperature/Umidità
    - Bioindicatori
    - Residui

77

## *“Trattamenti e convalide”*

- Processi di Sterilizzazione
  - Filtrazione
    - Filtri da 0.22 micron (o meno)
    - Questi filtri possono rimuovere la maggior parte dei batteri e muffe, ma non tutti i virus
    - Abbinato ad altri tipi di sterilizzazione
    - Verifiche di integrità dei Filtri (prima e dopo L'uso)
    - Tempo di filtrazione e pressioni definite

78

### *“Trattamenti e convalide”*

- La convalida dei processi (es. di sterilizzazione a fronte di norme es. EN 550-552-554 ) va supportata da qualifica delle attrezzature, test di bioburden (prodotto), monitoraggi ambientali (trends) e di sterilità del prodotto finito
  - Qualifica
    - Fisico (sonde)
    - Microbiologico (Bioindicatori)
  - Qualifiche carichi e cicli
  - Ripetizioni prove con ricerca del worst case
  - Verifica periodica
  - Documentazione

79

### *“Trattamenti e convalide”*

- Produzioni Asettiche (Media Fill)
  - Convalida con utilizzo di un terreno nutritivo liquido
  - Riempimento di una quantità definita di unità
  - Simulazione di tutte le operazioni ordinarie e straordinarie
  - Monitoraggi ambientali (particelle e micro)
  - Partecipazione di tutto il personale operativo, compreso meccanici
  - Verifica del numero di unità risultate contaminate (non sterili)  $< 1 \times 10^{-3}$
  - Documentazione e ripetizione periodica

80

### *“Trattamenti e convalide”*

- Controllo di qualità
  - Controlli della carica microbica iniziale nei prodotti
  - Monitoraggi microbiologici ambientali
  - Prodotti finiti
    - Il test di sterilità convalidato (sec. Ph.Eu.)
    - Campioni prelevati per i test di sterilità rappresentativi di tutto il lotto
    - Campioni prelevati da zone più a rischio di contaminazione devono essere inclusi nei test di sterilità

81

### *“Documentazione di supporto”*

- Procedure , istruzioni , protocolli , reports e registrazioni
  - Fabbricazione e modalità operative
  - Trattamento igienico prodotto (lavaggio)
  - Processi speciali e convalide (media fill, sterilizzazioni)
  - Pulizia e disinfezione locali ed attrezzature
  - Manutenzione
  - Accesso clean rooms ed abbigliamento
  - Controlli ambientali
  - Igiene ed addestramento personale
  - Controllo qualità prodotti e fluidi (test e verifiche)
  - Gestione deviazioni ed indagini

82

### *“Documentazione di supporto”*

- Monitoraggi e controlli
  - Qualifica aree e periodicità
  - Interruzione operatività e ripresa
  - Classificazione aree, mappe e punti campionamento
  - Particellari : frequenza, modalità, limiti allerta ed azione
  - Microbiologici : frequenza, modalità, limiti allerta ed azione, identificazione flora e resistenza
  - Acqua : frequenza, modalità, criteri di accettazione
  - Esecuzione controlli , interni ed esterni (qualifiche)
  - Strumenti e tarature, certificati e risultati
  - Riesame dati monitoraggi, trends , azioni
  - Registrazioni e conservazione

83

### *“Documentazione di supporto”*

- Personale
  - Responsabilità, requisiti e prestazioni
  - Gestione stato salute e controlli
  - Operatività ed addestramento, piani ed attività
    - Igiene personale
    - Vestizione e monitoraggi
    - Comportamento e tecniche asettiche
    - Fondamenti microbiologia
    - Valutazione efficacia
    - Mantenimento conoscenze e frequenza
  - Registrazioni e conservazione

84

### *“Documentazione di supporto”*

- Pulizia , disinfezione, sterilizzazione
  - Programmi , modalità , frequenza
  - Convalide , certificati di sterilizzazione
  - Prodotti e schede tecniche
  - Qualifiche e test efficacia
  - Preparazione e diluizioni detergenti e disinfettanti
  - Scadenze e rotazioni
  - Protezione ambienti/attrezzature pulite
  - Holding time (sporco/pulito)
  - Movimentazione materiali sporchi
  - RegISTRAZIONI attività, log books, conservazione

85

### *“Documentazione di supporto”*

- Manutenzione
  - Programmi (preventiva e correttiva)
  - Modalità e frequenza
  - Intervento in aree produttive e su linee produttive/attrezzature
  - Sanitizzazione/sterilizzazione impianti produzione e distribuzione acqua PW/WFI
  - Controlli e sostituzione filtri HEPA , Cappe Flusso Laminare
  - Criteri di riqualifica attrezzature, impianti, processi
  - RegISTRAZIONE attività e log books, conservazione

86

*Il tutto secondo i requisiti della norma  
UNI EN ISO 13485 e DIR 93/42 e  
successivi aggiornamenti*



87



***Grazie per l'attenzione***

***Questions?***

88