

2.0- SCELTA DELL'AMBIENTE DI LAVORAZIONE

INTRODUZIONE

Parleremo brevemente della qualità dell'aria nelle produzioni farmaceutiche e della relativa scelta degli appropriati ambienti di lavorazione per quanto riguarda farmaci sia non sterili che sterili.

La tipologia degli ambienti di lavorazione è riportata per grandi linee nelle NBP della Farmacopea Ufficiale. Riportiamo integralmente, nella sezione approfondimento, il punto 4 delle NBP.

APPROFONDIMENTO

4. LABORATORIO E ATTREZZATURE

4.1. Il laboratorio della farmacia deve essere adeguato ad assicurare le corrette operazioni di preparazione, confezionamento, etichettatura e controllo dei medicinali. La zona destinata alla preparazione deve essere separata o deve avere la possibilità di essere isolata mediante una funzionale compartimentazione che ne impedisca l'attraversamento; in ogni caso, durante l'attività di preparazione dei medicinali l'accesso alla zona di lavoro deve essere controllato e riservato al personale addetto a quel preciso compito.

Il laboratorio deve avere le pareti, il soffitto e il pavimento di materiale non poroso, preferibilmente liscio, resistente e non sgretolabile, privo di parti che perdono il rivestimento, capace di sopportare l'acqua calda e i detergenti; la pulizia deve avvenire regolarmente secondo procedure appropriate, che garantiscano la massima igiene e, se le circostanze lo richiedono, la sanitizzazione dell'ambiente. Il laboratorio deve avere un piano di lavoro di materiale inerte, resistente, di facile pulizia e disinfezione, se necessario. Le condizioni ambientali come la luce solare, l'illuminazione, la temperatura, l'umidità, la ventilazione, ecc. devono essere appropriate e tali da non esercitare effetti negativi, direttamente o indirettamente, sulla preparazione dei medicinali e sul corretto funzionamento delle apparecchiature; se necessario, le condizioni ambientali devono poter essere controllate per adattare alle varie esigenze.

Il laboratorio deve essere mantenuto sempre libero da qualunque infestazione mediante adeguate misure preventive.

Il laboratorio deve essere soggetto ad un adeguato programma di manutenzione periodica.

4.2. Le strutture presenti devono essere conformi alla vigente normativa sotto il profilo della sicurezza e devono rispondere ai requisiti richiesti dal sistema di assicurazione della qualità sotto il profilo del controllo, del funzionamento e della gestione delle emergenze derivanti da rotture o interruzioni di corrente. Il laboratorio dovrebbe poter disporre di gruppi di continuità elettrica allo scopo di assicurare in condizioni di emergenza il continuo funzionamento di apparecchi che hanno un impatto sulla qualità della preparazione; tali gruppi di continuità devono essere soggetti a manutenzione e controllo.

4.3. Le apparecchiature, gli utensili, il corredo di vetreria e la strumentazione, oltre quello minimo previsto dalla Tabella n. 6 della F.U., devono essere adeguati al numero ed alla natura delle preparazioni abitualmente eseguite. Le apparecchiature non devono alterare le sostanze con cui vengono a contatto, nè contaminarle con prodotti, come i lubrificanti, necessari al loro funzionamento; esse dovrebbero essere facilmente smontabili per consentirne una regolare pulizia. La vetreria e la strumentazione devono essere accuratamente pulite dopo ogni utilizzo e, se necessario, disinfettate e sterilizzate; la vetreria, gli utensili e le apparecchiature devono essere conservati adeguatamente in apposita zona.

Nella preparazione di medicinali sterili si deve usare solo vetreria sterile e parti sterili monouso oppure sterilizzate mediante trattamento convalidato periodicamente.

Tutte le apparecchiature, in particolare quelle che generano movimento o riscaldamento, devono essere utilizzate da personale all'uopo addestrato secondo procedure scritte.

Gli strumenti di misura devono essere periodicamente e regolarmente controllati e calibrati secondo dei programmi di uso e di manutenzione che prevedano anche semplici procedure di verifica dello strumento prima di ogni utilizzazione.

Le NBP al punto 4 riportano: *“se necessario, le condizioni ambientali devono poter essere controllate per adattare alle varie esigenze”*. Per quanto riguarda l'aria le condizioni ambientali da tenere sotto controllo sono essenzialmente 3:

1. l'aspetto microbiologico,
2. la temperatura e l'umidità,
3. la contaminazione aeroportata che riguarda sia la qualità dei prodotti che la sicurezza degli operatori.

In specifiche attività lavorative la qualità dell'aria riveste un ruolo fondamentale. Deve presentare precisi requisiti per permettere la buona riuscita del ciclo di produzione ed il

mantenimento di condizioni ottimali per il benessere degli operatori. Questo può essere raggiunto attraverso un'appropriata progettazione degli ambienti di lavoro, dei relativi sistemi di aereazione e climatizzazione e con la messa a punto di appropriate strategie di controllo.

Quando ciò viene realizzato e validato si dice che l'impianto in generale è a "contaminazione controllata".

La qualità dell'aria nelle preparazioni farmaceutiche è importante per tre aspetti:

- La sicurezza dell'operatore: durante l'allestimento di un farmaco l'operatore può essere sottoposto a rischi per la salute. Ogni sostanza ha dei precisi valori tossicologici, a livello orale, cutaneo e inalatorio, in base ai quali il direttore del laboratorio decide, sotto la sua responsabilità, le modalità di manipolazione, individuando protezioni individuali e attrezzature (impianti aspiranti, cappe chimiche per tossici, cappe a flusso laminare) ben specifiche che rendano il lavoro sicuro.
- La qualità microbiologica e la purezza chimico-fisica della forma farmaceutica da produrre: quali siano i contaminanti da controllare è strettamente dipendente dal processo che è in relazione con la specifica forma farmaceutica. Anche in questo caso il direttore stabilisce il grado di purezza atmosferica dell'ambiente che, come vedremo in seguito, è rappresentato nelle GMP in 4 diversi gradi.
- La temperatura e l'umidità relativa ambientale che devono essere ottimali per lo stoccaggio e la manipolazione delle sostanze e per permettere un'attività lavorativa con un sufficiente comfort.

Quindi, tutti i processi produttivi eseguiti nelle produzioni farmaceutiche devono necessariamente essere realizzati in aria confinata o in aree a contaminazione controllata.

Il più alto grado di purezza dell'aria in farmaceutica è richiesto per le produzioni "in sterilità" che sono state, fino a qualche anno fa, una esclusiva dei farmaci per uso iniettabile e oftalmico. Oggi, grazie ai progressi tecnologici, che hanno abbattuto notevolmente i costi di realizzazione, controllo e manutenzione delle aree in sterilità, anche le produzioni cosmetiche ed erboristiche stanno iniziando a considerare le lavorazioni in "sterilità" (cosmetici monouso, estratti fitoterapici acquosi per uso orale senza conservanti, etc.).

Per comprendere bene le strategie da mettere in atto per ottenere un miglioramento della qualità dell'aria, bisogna tener ben presente le dimensioni dei contaminanti che vogliamo ridurre o eliminare.

Contaminanti aerei	Dimensioni delle particelle in micron
Particolato atmosferico	0,2 / 500
Cheratinociti provenienti dalla continua desquamazione della pelle	20
Batteri	0,3 / 20
Funghi e Miceti	4 / 20
Virus	0,02 / 0,3

2.1- Qualità dell'aria e contaminazione aeroportata

Composizione dell'aria:

L'aria secca al suolo è composta all'incirca per il 78% V/V di azoto, per il 21% V/V di ossigeno, per l'0,9% V/V di argon e per lo 0.04% V/V di anidride carbonica, più altri componenti in quantità minori.

L'aria cosiddetta "aria umida" può contenere alte percentuali di vapore acqueo; tale percentuale dipende dal tasso di umidità relativa dell'aria e dalla temperatura ed è limitata

dalla pressione di vapore saturo dell'acqua. La massima percentuale contenibile dipende dalla temperatura aumentando con essa.

Composizione dell'aria secca			
Nome	Formula	Proporzione o frazione molecolare[ppm1]	% (m/m)
Azoto	N ₂	78,08 %	75,37 %
Ossigeno	O ₂	20,95 %	23,1 %
Argon	Ar	0,934 %	1,41 %
Diossido di carbonio	CO ₂	388 ppm	
Neon	Ne	18,18 ppm	
Elio	He	5,24 ppm	
Monossido di azoto	NO	5 ppm	
Kripton	Kr	1,14 ppm	
Metano	CH ₄	1 / 2 ppm	
Idrogeno	H ₂	0,5 ppm	
Ossido di diazoto	N ₂ O	0,5 ppm	
Xeno	Xe	0,087 ppm	
Diossido di azoto	NO ₂	0,02 ppm	
Ozono	O ₃	da 0 a 0,01 ppm	
Radon	Rn	6,0×10 ⁻¹⁴ ppm	

Nell'analisi della qualità dell'aria bisogna distinguere due classi di contaminanti: il particolato atmosferico e il bioaerosol.

Il particolato atmosferico è costituito da vari contaminanti di natura organica e inorganica. Le particelle che lo compongono sono di dimensioni molto variabili comprese generalmente fra i 0,2 e i 500 micron. La tipologia di contaminanti varia molto a secondo se la zona considerata è urbana, semi-urbana o rurale. Naturalmente le maggiori percentuali di contaminanti si raggiungono nelle zone intensamente urbanizzate e aperte al traffico su gomma.

APPROFONDIMENTO

Con i termini particolato, particolato sospeso, pulviscolo atmosferico, polveri sottili, polveri totali sospese, si identificano comunemente l'insieme delle sostanze sospese in aria come ad esempio fibre particellari carboniose, metalli, inquinanti liquidi o solidi.

Il particolato sospeso è costituito dall'insieme di tutto il materiale non gassoso in sospensione nell'aria e quello tipico delle aree urbane, è composto da particelle liquide e solide disperse nell'atmosfera con un diametro che va da pochi nanometri fino ai 500 micron.

Le particelle, a causa delle loro piccole dimensioni, restano sospese in atmosfera per tempi più o meno lunghi; le polveri totali sospese o **PTS** vengono anche indicate come **PM** (Particulate Matter). Il particolato nell'aria può essere costituito da diverse sostanze: sabbia, ceneri, polveri, fuliggine, sostanze silicee di varia natura, il materiale inorganico prodotto da agenti naturali (vento e pioggia), dall'erosione del suolo materiale organico disperso dai vegetali (pollini e frammenti di piante), composti metallici, fibre tessili naturali e artificiali, sali, elementi come il carbonio o il piombo, ecc.

Nelle aree urbane il particolato sospeso può avere origine da lavorazioni industriali (cantieri edili, fonderie, cementifici), dall'usura dell'asfalto, dei pneumatici, dei freni e delle frizioni e dalle emissioni di scarico degli autoveicoli, in particolare quelli con motore Diesel.

In base alla natura e alle dimensioni delle particelle possiamo distinguere:

- gli **aerosol**, costituiti da particelle solide o liquide sospese in aria e con un diametro inferiore a 1 micron;
- le **foschie**, date da goccioline con diametro inferiore a 2 micron;
- le **esalazioni**, costituite da particelle solide con diametro inferiore ad 1 micron e rilasciate solitamente da processi chimici e metallurgici;

- il **fumo**, dato da particelle solide di solito con diametro inferiore ai 2 micron e trasportate da miscele di gas;
- le **polveri** (vere e proprie), costituite da particelle solide con diametro fra 0,25 e 500 micron;
- le **sabbie**, date da particelle solide con diametro superiore ai 500 micron.

Le **particelle primarie** sono quelle che vengono emesse come tali dalle sorgenti naturali ed antropiche, mentre le **secondarie** si originano da una serie di reazioni chimiche e fisiche in atmosfera. Le **particelle fini** sono quelle che hanno un diametro inferiore a 2,5 micron, le altre sono dette **grossolane**. Da notare che il particolato grossolano è costituito esclusivamente da particelle primarie. Le polveri **PM10** rappresentano il particolato che ha un diametro inferiore a 10 micron, mentre le **PM2,5**, che costituiscono circa il 60% delle PM10, rappresentano il particolato che ha un diametro inferiore a 2,5 micron.

Vengono dette **polveri inalabili** quelle in grado di penetrare nel tratto superiore dell'apparato respiratorio (dal naso alla laringe).

Le **polveri toraciche** sono quelle in grado di raggiungere i polmoni.

Le **polveri respirabili** possono invece penetrare nel tratto inferiore dell'apparato respiratorio (dalla trachea fino agli alveoli polmonari).

Per evitare che il particolato atmosferico possa contaminare gli ambienti di lavorazione, è essenziale che le finestre degli ambienti di un laboratorio farmaceutico siano sempre chiuse ovvero che si lavori in "*ambiente confinato*". I ricambi dell'aria avverranno attraverso aspiratori dedicati ai quali, preferibilmente, dovranno essere applicati filtri depuranti.

Contaminazione aeroportata: *Microbiologia ambientale*; il Bioaerosol

Nelle produzioni farmaceutiche bisogna rispettare, nel prodotto finito, i limiti di UFC riportati in Farmacopea e il particolato microbiologico di maggior interesse va da 0,5 a salire.

Le particelle di origine microbica non sono in grado di viaggiare nell'aria da sole. Si diffondono nell'aria trasportate da goccioline d'acqua, polveri e pulviscolo. Tutte le tipologie di microrganismi possono essere presenti nell'aria e sulle superfici: batteri, funghi e protozoi, così come quei virus capaci di resistere in un mezzo esterno.

L'insieme di un sistema disperso di particelle liquide o solide in aria o gas associato a batteri, lieviti, muffe, spore, virus, alghe, costituiscono il Bioaerosol. Esso è caratterizzato da particelle con un diametro che varia dai 0,5 ai 20 micron.

I principali fattori che influenzano il comportamento del Bioaerosol sono di natura chimica, biologica e fisica: moti browniani, forza gravitazionale, umidità.

Riportiamo in basso la tabella dei limiti microbiologici massimi ammessi nelle sostanze e nelle forme farmaceutiche non sterili, tratta dalla Farmacopea Italiana XII edizione - 2012.

Qualità microb. delle preparaz. farmaceutiche e delle sostanze per uso farmaceutico non sterili

Tabella 5.1.4-1. Criteri di accettazione per la qualità microbiologica delle Forme Farmaceutiche non sterili

Via di somministrazione	CMAT (UFC/g o UFC/ml)	CFLT (UFC/g o UFC/ml)	Microrganismi specificati
Preparazioni non acquose per uso orale	10 ³	10 ²	Assenza di <i>Escherichia coli</i> (1 g o 1 ml)
Preparazioni acquose per uso orale	10 ²	10 ¹	Assenza di <i>Escherichia coli</i> (1 g o 1 ml)
Uso rettale	10 ³	10 ²	—
Uso per mucosa orale Uso gengivale Uso cutaneo Uso nasale Uso auricolare	10 ²	10 ¹	Assenza di <i>Stafilococcus aureus</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g o 1 ml)
Uso vaginale	10 ²	10 ¹	Assenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Stafilococcus aureus</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Candida albicans</i> (1 g o 1 ml)
Cerotti transdermici (limiti per cerotto transdermico, incluso lo strato adesivo ed il supporto)	10 ²	10 ¹	Assenza di <i>Stafilococcus aureus</i> (1 cerotto) Assenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 cerotto)
Uso inalatorio (requisiti specifici si applicano alle preparazioni liquide dispensate mediante nebulizzazione)	10 ²	10 ¹	Assenza di <i>Stafilococcus aureus</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g o 1 ml) Assenza di batteri gram-negativi resistenti ai sali biliari (1 g o 1 ml)
Disposizione apposita della Farmacopea Europea per le forme farmaceutiche orali contenenti materie prime di origine naturale (animale, vegetale o minerale) che non consentono un trattamento antimicrobico preliminare e per le quali l'Autorità competente ammette una CMAT delle materie prime superiore a 10 ³ UFC per grammo o per millilitro	10 ⁴	10 ²	Non più di 10 ² UFC di batteri gram-negativi resistenti ai sali biliari (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Salmonella</i> (10 g o 10 ml) Assenza di <i>Escherichia coli</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Stafilococcus aureus</i> (1 g o 1 ml)
Disposizione apposita della Farmacopea Europea per i medicinali a base di piante composte esclusivamente da una o più droghe vegetali (intere, in frammenti o in polvere): - medicinali a base di piante ai quali si aggiunge acqua bollente prima dell'uso - medicinali a base di piante ai quali non si aggiunge acqua bollente prima dell'uso	10 ⁷ 10 ⁵	10 ⁵ 10 ⁴	Non più di 10 ² UFC di <i>Escherichia coli</i> (Vedi Appendice) (1 g o 1 ml) Non più di 10 ³ UFC di batteri gram-negativi resistenti ai sali biliari (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Escherichia coli</i> (1 g o 1 ml) Assenza di <i>Salmonella</i> (10 g o 10 ml)

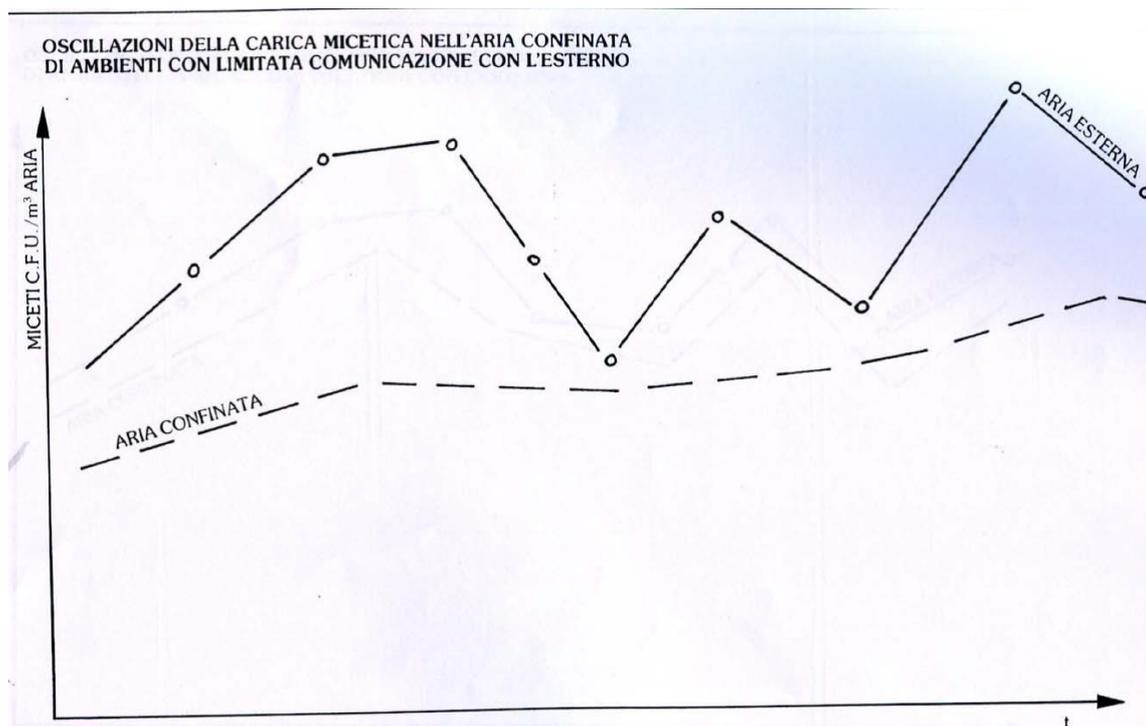
UFC = unità formanti colonia ovvero numero di microrganismi che, una volta incubati in terreno di coltura e in termostato, sono capaci di formare colonie.

CMAT = conta di UFC relativa a microrganismi aerobi;

CFLT = conta di UFC relativa a funghi e lieviti.

Come si vede i valori limite sono piuttosto alti e facilmente raggiungibili mettendo in atto facili accorgimenti di pulizia e sanitizzazione. Controlli periodici sulla qualità microbiologica ambientale del laboratorio sono già obbligatori in base alle regole dettate dall'HACCP. A questi sarebbe buona regola aggiungere dei controlli periodici sulle produzioni farmaceutiche (capsule, pomate, etc.) al fine di validare le istruzioni operative anche da un punto di vista microbiologico. Il pericolo di inquinamento deriva quasi sempre o da materie prime o, ancor più spesso, dall'operatore. E' quindi indispensabile selezionare accuratamente i fornitori, che devono certificare il rispetto delle regole GMP, e gli operatori che devono essere in grado di seguire con attenzione le pratiche igieniche presenti nelle istruzioni operative del laboratorio, specialmente per quel che riguarda le operazioni di pulizia e sanitizzazione personale, delle attrezzature, dei banchi di lavoro e degli ambienti in generale.

L'interesse per la misura della contaminazione microbica dell'aria si è particolarmente sviluppato negli ultimi 25 anni. Per questo motivo, in un laboratorio o in qualsiasi luogo di produzione, è fondamentale avere un corretto piano di autocontrollo per poter prevenire e minimizzare una possibile contaminazione che può essere riconducibile alle materie prime (*contaminazione primaria*) agli operatori o ai processi di trasformazione provocati dalle attrezzature e dall'ambiente (*contaminazione secondaria*). Periodicamente è essenziale implementare, a cadenze temporali ben definite, un monitoraggio sulle superfici (banchi di lavoro, pareti, pavimenti, mensole, attrezzature etc.), mentre la temperatura e l'umidità ambientale vanno monitorate in tempo reale attraverso strumenti di misura con possibilità di registrazione dei dati (datalogger).



In ambito farmaceutico si deve lavorare sempre in "aria confinata" cioè in aria non a diretto contatto con l'aria esterna e con ambienti estranei all'attività del laboratorio. Nella tabella su riportata vediamo le sensibili differenze, in termini di CFLT, fra l'aria esterna e quella semplicemente confinata (a finestre e porte chiuse). Al fine quindi di contenere la contaminazione aerea proveniente dall'esterno, il laboratorio va protetto con infissi a tenuta perfetta, evitandone il più possibile l'apertura. Il passaggio diretto dell'aria esterna all'interno del laboratorio innalza drasticamente la contaminazione aeroportata. E' buona norma che i laboratori di farmacia siano ospitati in locali nettamente separati dal pubblico e che non vengano attraversati se non dal personale addetto alle produzioni. Le porte di comunicazione

del laboratorio con altri locali (uffici, area vendita, magazzini, etc.) devono avere chiusure ermetiche e restare aperte per il minor tempo possibile. Finestre e balconi che danno all'esterno devono rimanere sempre chiusi (o essere aperti solo per brevi periodi e quando non vi è attività produttiva) e protetti dagli insetti con zanzariere. Il ricambio dell'aria all'interno del laboratorio va calcolato in base al numero di addetti alle lavorazioni e dovrebbe avvenire sempre attraverso un qualche tipo di filtrazione.

Punti cruciali risultano essere:

- gli impianti di ventilazione e climatizzazione che se non calibrati e revisionati perfettamente possono essere causa di contaminazione microbiologica anche grave;
- l'idoneità delle procedure e delle istruzioni operative;
- un sufficiente addestramento degli operatori al fine di sviluppare comportamenti lavorativi consoni (procedure specifiche: lavaggio delle mani, uso e ricambio dei guanti e dei camici, cuffie, etc.).

Il rispetto di questi punti cruciali riduce al minimo le possibilità di contaminazione dei prodotti finiti.

SUGGERIMENTO

Una maniera facile ed economica per purificare l'aria di un ambiente da polvere e batteri è quella di installare all'interno o su parete dei depuratori d'aria specifici. Sono macchine munite di una ventola aspirante che filtra l'aria e la sottopone a intenso irraggiamento UVC restituendola all'ambiente con carica batterica abbattuta di oltre il 99,99% e carica virale del 99%. L'uso di tali apparecchi possono portare l'ambiente di lavoro in grado C at REST.



UV-Fan a parete



UV-FAN con piedistallo trasportabile.

Le direttive specifiche in materia stabiliscono, in base alla tipologia di produzione, il grado di purezza atmosferica e cioè fino a che punto va eliminata la contaminazione aeroportata.

Direttive riguardanti la contaminazione aeroportata.

Le principali direttive riguardanti la contaminazioni aeroportata, sono:

- Federal Standard 209 Rev.E
- ISO 14644
- NASA (NBH 5340-2)
- GMP Annex I

APPROFONDIMENTO

Le norme da rispettare in produzione farmaceutica (farmaci, dispositivi medici e prodotti per la diagnostica) sono le GMP ma spesso, nelle specifiche tecniche delle apparecchiature adoperate, si trovano anche riferimenti alle altre Normative e ciò può generare confusione.

Storicamente le prime camere bianche furono realizzate negli U.S.A. dove fu elaborato il primo standard relativo al controllo ed alla classificazione della qualità dell'aria in funzione della contaminazione aeroportata (F.S. 209 A).

E' bene ricordare che, l'elemento fondamentale che rese possibile la realizzazione delle prime camere bianche, fu la disponibilità commerciale a costi ragionevoli dei cosiddetti filtri assoluti, disponibilità dovuta al massiccio uso che se ne faceva, e se ne fa, negli impianti di ventilazione dei centri nucleari. Al settore nucleare, la moderna impostazione degli impianti a contaminazione controllata, deve anche i suoi fondamenti teorici, l'analisi dei rischi, dell'affidabilità, l'impostazione dei controlli e della manutenzione.

Si creò la necessità di classificare gli ambienti in base alla qualità dell'aria. Storicamente questo tipo di classificazione fu fatto negli USA a cura dell'Institut of Environmental Science all'inizio degli anni '60 e riportato in una norma, il **Federal Standard 209**.

Come elemento di classificazione fu presa la concentrazione di particelle aventi diametro equivalente maggiore o uguale a 0.5 micron, questo perché i contatori di particelle all'epoca erano affidabili solo per questi diametri.

La concentrazione viene espressa in particelle/piede³. I valori di concentrazione inizialmente considerati furono (FS 209 A e B non emendato), 100, 10.000 e 100.000. particelle per piede cubico, in seguito fu poi aggiunta la concentrazione 1.000. Vediamo in dettaglio le varie classi :

Classe 100 :

Il conteggio delle particelle non eccede un totale di 100 per piede cubico (3.500 particelle per m³) di diametro maggiore o uguale a 0,5 micron con zero particelle maggiori di 5 micron.

Classe 1.000 :

Il conteggio delle particelle non eccede un totale di 1.000 per piede cubico (35.000 particelle per m³) di diametro maggiore o uguale a 0,5 micron.

Classe 10.000 :

Il conteggio delle particelle non eccede un totale di 10.000 per piede cubico (350.000 per m³) di diametro maggiore o uguale a 0,5 micron, o 70 particelle per piede cubico (45 per litro) di diametro maggiore o uguale a 5 micron.

Classe 100.000 :

Il conteggio delle particelle non eccede un totale di 100.000 per piede cubico (3.500 particelle per litro) di diametro maggiore o uguale a 0,5 micron, o 700 particelle per piede cubico (25 particelle per litro) di diametro maggiore o uguale a 5 micron.

Finora abbiamo parlato di particelle in senso generale, è però da tener presente che una parte di quelle presenti nell'aria è costituita dalle cosiddette particelle formanti colonia (U.F.C.). Purtroppo il rapporto tra le inerti e le totali varia enormemente da ambiente ad ambiente e di conseguenza non è possibile risalire dal conteggio totale, che può fornire un contatore di particelle, al numero di U.F.C. per soddisfare le proprie esigenze di classificazione degli ambienti in funzione del contenuto microbiologico. La NASA nel 1967 emise uno standard (NHB 5340-2) nel quale le definizioni di classe di contaminazione riportate nel F.S.209 A venivano completate con l'aggiunta del contenuto massimo di U.F.C. sia dell'aria che delle superfici.

Le quantità di U.F.C. per ogni classe sono le seguenti:

Classe 100 :

Il conteggio delle U.F.C. non eccede 0,1 per piede cubico di aria (3,5 per m³) con valore medio di fallout non superiore a 1.200 per piede quadrato (12.900 per mq) per settimana sulle superfici orizzontali.

Classe 10.000 :

Il conteggio delle U.F.C. non eccede 0,5 per piede cubico di aria (17,6 per m³) con un valore medio di fallout non superiore a 6.000 per piede quadrato (64.600 per mq) per settimana sulle superfici orizzontali.

Classe 100.000 :

Il conteggio di particelle trasportanti microrganismi non eccede 2,5 per piede cubico (88,4 per m³) con un fallout medio non superiore a 30.000 per piede quadrato (323.000 per mq) per settimana su superfici orizzontali).

Questi valori di conteggi microbiologici non vanno intesi nel senso che ogni tante particelle ve ne è un certo quantitativo "vive" ma nel senso che certe operazioni devono essere fatte con 0,1 U.F.C. /piede cubico ed altre, invece, possono essere fatte, ad esempio, con 0,5 U.F.C./piede cubico.

Nell'industria farmaceutica, dove questo standard è concettualmente, abbastanza seguito, veniva normalmente imposto per le clean rooms, destinate ad essere utilizzate come sale sterili, la classe 100 del Federal Standard 209B sui punti dove il prodotto è esposto, con l'aggiunta che il contenuto microbiologico medio dell'aria doveva essere inferiore alle 3-4 C.F.U./m³.

Nel 1988 comparve la revisione "D" del F.S. 209 secondo la quale la definizione di classe di contaminazione è riferita solo alla qualità dell'aria indipendentemente dal fatto che si tratti di una camera bianca o di una stazione di lavoro pulita all'interno di un ambiente normale. Le variazioni più significative riguardano le condizioni nelle quali si deve valutare la classe. Il 209B definiva le classi di contaminazione durante i periodi di lavoro, mentre il 209D specifica che le condizioni a cui devono essere fatti i test possono essere:

"Camera Bianca non attrezzata" (AS BUILT):

camera Bianca o zone pulite pronte ad entrare in funzione con tutti i servizi connessi, ma senza equipaggiamenti di produzione personale;

"Camera Bianca in condizioni di riposo" (AT REST):

camera Bianca o zona pulita completata con le sue macchine di processo ma senza personale;

"Camera Bianca operativa" (OPERATIONAL):

camera Bianca o zona pulita in normale attività lavorativa con personale e macchine di processo.

Vengono aggiunte due nuove classi, classe 1 e classe 10, che sono definite in funzione del numero di particelle uguali o maggiori di 0,5 micron per piede cubico. Questo per analogia alle classi di contaminazione precedentemente definite. La concentrazione delle particelle, per la valutazione della classe, può ora essere misurata per diametri di 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 e 5 micron a seconda della classe da valutare. La scelta dei diametri e dei volumi da campionare è effettuata in modo da avere dei conteggi statisticamente validi.

Nel 1992 è uscita l'ultima revisione del F.S. 209, la versione "E".

In quest'ultima revisione la definizione di classi di contaminazione non fa più riferimento alle curve di contaminazione, ma esclusivamente al seguente concetto: *"La classe di contaminazione in unità metriche è data dal logaritmo in base 10 del massimo numero ammissibile di particelle aventi diametro equivalente maggiore o uguale a 0,5 micron per metro cubo. La denominazione in unità inglesi (per gli utilizzatori U.S.A.) è data dal massimo numero di particelle per piede cubico aventi diametro maggiore o uguale a 0,5 micron."*

Nel 2009 le direttive F.S. diventano obsolete per cedere il passo alle Norme ISO 14644 e GMP.

Attualmente gli ambienti a contaminazione controllata e le attrezzature in grado di generarli, vengono definiti dalla normativa ISO 14644-1 "Clean Rooms and Associated Environments".

Classi di pulizia per particelle aerotrasportate e le corrispondenti concentrazioni di particelle aventi diverse dimensioni, secondo le norme ISO14644 e FS209E. Principali classi di contaminazione particellare per camere bianche e zone controllate

Classe	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1000	237	102	35	8	-
ISO 4	10000	2370	1020	352	83	-
ISO 5	100000	23700	10200	3520	832	29
ISO 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO 7	-	-	-	352000	83200	2930
ISO 8	-	-	-	3520000	832000	29300
ISO 9	-	-	-	3520000	832000	293000

Per quanto riguarda la produzione farmaceutica bisogna rifarsi alle GMP che distinguono 4 classi di purezza dell'aria in base al numero di particelle da 0,5 e 5 micron in esse presenti per ogni m³:

Normative Europee EC-GMP ANNEX 1 2009

Numero Massimo di particelle ammesse per m ³ superiore alle dimensioni del tabulato.				
	At rest		In operation	
Grado	0.5 µm	5.0µm	0.5 µm	5.0µm
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 definito	Non definito

Per quanto riguarda gli ambienti, le GMP considerano i vari gradi in due condizioni:

At Rest: ambienti di laboratorio in assetto produttivo (completi di arredi, strumenti e attrezzature) ma non operativi;

In Operation: ambienti di laboratorio in assetto produttivo con personale ed operativi.

La definizione As Built si riferisce invece ad ambienti progettati per una contaminazione aeroportata controllata ma completamente nudi, ovvero privi di qualsiasi arredo, attrezzatura e personale.

Per quanto riguarda le attrezzature in grado di produrre ambienti a contaminazione aeroportata controllata, quali possono essere cappe a flusso laminare, condotti e pareti filtranti, etc., bisogna sottolineare il fatto che anche se un'attrezzatura è in grado di generare un ambiente ISO5 (o in grado A) non è detto che una volta allocata nel laboratorio riesca effettivamente a generarlo. E' necessario distinguere i due concetti. Infatti solo la giusta tipologia di ambiente e il giusto punto in cui viene allocata una attrezzatura, insieme a delle precise e validate istruzioni operative riguardanti le modalità di produzione, creano la possibilità che essa possa effettivamente generare un ambiente di tipo A. Insomma la potenzialità di un'attrezzatura di creare un ambiente A è da considerarsi condizione necessaria ma non sufficiente per il raggiungimento dello scopo. Anche piccole variazioni di disposizione di arredi e attrezzature all'interno degli ambienti, possono interferire con i flussi di aria peggiorandone la qualità. Al fine di mantenere costanti gli standard prefissati, è buona norma che gli ambienti a contaminazione aeroportata controllata vengano validati periodicamente in operation.

La comparazione fra le principali classi è possibile con una sufficiente approssimazione solo per le particelle da 0,5 micron. Per quelle da 5 micron i valori si discostano maggiormente.

Tab.6: Tabella conversione norme ISO14644 / FS209E /Norme di Buona Preparazione F.U. La tabella di conversione è relativa alle particelle di 0,5 µm.						
Norma	Classe					
ISO 14644	3	4	5	6	7	8
F.S. 209 E	1	10	100	1000	10000	100000
EC-GMP ANNEX 1 2003 (NBP F.U.)	-	-	A	B	C	D

Il controllo, il monitoraggio e la validazione delle varie classi di contaminazione aeroportata la si può effettuare con due metodi:

- Da un punto di vista fisico, misurando il numero e il diametro delle particelle rilevate in un volume preciso di aria. Tali misurazioni avvengono tramite l'ausilio di strumenti denominati contaparticelle. Sono strumenti di misura che, aspirando l'aria attraverso una pompa, effettuano le misurazioni mediante l'ausilio di una lampada laser. Non sono in grado di distinguere i microrganismi dalle polveri e dai liquidi in sospensione aerea ma forniscono un report preciso sulla purezza generica dell'aria da un punto di vista strettamente fisico. Sono attualmente gli strumenti più adoperati per verificare la qualità dell'aria. Le GMP prevedono regole precise per la definizione della classe dell'aria di un ambiente. La quantità di aria e il numero di campionamenti è in relazione con le aree degli stessi. In commercio vi sono vari tipi di contaparticelle: di tipo fisso, portatile e palmare e con pompe di diversa potenza. I tempi di certificazione per un ambiente ovviamente sono inversamente proporzionali alle potenze delle pompe aspiranti. Grazie allo sviluppo tecnologico e all'affidabilità di tali strumenti, le produzioni a contaminazione aeroportata controllata sono divenute negli ultimi anni più economiche e sicure. Oggi, infatti, a differenza di qualche decennio fa, i prodotti iniettabili vengono formulati senza l'aggiunta di conservanti, in quanto si ha la possibilità di effettuare precisi monitoraggi in tempo reale dell'aria.
- Da un punto di vista microbiologico, misurando il numero e la tipologia di microrganismi con le tipiche piastre di coltura. Le GMP riportano regole precise anche per queste misurazioni. Oggi, per effettuare con precisione e rapidità tali misurazioni, si adoperano delle pistole con all'interno delle pompe di aspirazione. All'interno delle pistole si inseriscono le piastre che in seguito vengono incubate a temperature e tempi standardizzati.

Di seguito riportiamo le tabelle previste dalle GMP per i limiti microbiologici.

Grado	Limiti raccomandati per la contaminazione microbica (a)			
	L'aria del campione ufc/m ³	Piastre di contatto (diametro 90mm) ufc/4 ore	Piastre di contatto (diametro 55mm) ufc/4 ore	Stampo del guanto 5 dita ufc/guanto
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Le GMP riportano, per le preparazioni in sterilità, la purezza richiesta per gli ambienti in base alle specifiche attività.

Grado	Esempi di operazioni per prodotti sterilizzati
A	Riempimento di prodotti, insolitamente a rischio
C	Preparazione di soluzioni, insolitamente a rischio. Riempimento di prodotti
D	Preparazione di soluzioni e componenti per il successivo riempimento

Grado	Esempi di operazioni per preparazioni asettiche
A	Preparazioni asettiche e riempimento
C	Preparazione di soluzioni per essere filtrate
D	Gestione dei componenti dopo il lavaggio

CAPITOLO III : Filtri sterilizzanti HEPA / HULPA

La purezza dell'aria la si raggiungere forzandone i flussi attraverso idonei filtri.

Secondo le Normative EN-779 ed EN-1822 i filtri per purificazione dell'aria si suddividono nelle seguenti classi:

Gruppo "G" per polvere grossa

Gruppo "F" per polvere fine (≥ 5 micron)

Gruppo "H" e "U" ad alta efficienza (0,1/0,3 micron)

Questi filtri vengono generalmente montati in serie ma solo gli HEPA e gli HULPA vengono considerati sterilizzanti.

I filtri HEPA/ULPA ($e \geq 99,97\%$) hanno perdite di carico che dipendono solo dalla velocità e viscosità del mezzo che li attraversa.

L'efficienza aumenta con l'aumentare dell'intasamento, fino ad un limite massimo oltre il quale si può avere un danneggiamento del filtro stesso. L'efficienza dei filtri va controllata periodicamente attraverso il controllo della velocità dei flussi laminari ($0,45\text{m/s} \pm 20\%$) generati. Poiché i filtri, durante il loro uso si intasano progressivamente, tendono a far diminuire la velocità dei flussi. In fase di controllo periodico, si aumenta progressivamente nel tempo la velocità dei ventilatori che convogliano su di essi l'aria, per far rimanere i flussi entro i valori di norma. Quando la pressione dell'aria raggiunge il valore soglia, oltre il quale si entra nella possibilità di lacerazione del filtro, il filtro va sostituito. I controlli della velocità dei flussi viene effettuato con un anemometro a filo caldo.

CONFRONTO LA CLASSIFICAZIONE EUROVENT4/4 E LA NORMATIVA CEN 1822-4			
Classi di filtrazione per filtri HEPA e ULPA			
e% (MPPS)	classe	e%(0,3mm) (DOP)	Eurovent
85		95	
95	H10	98	
99	H11	99,9	EU10
99,5			
99,9	H12	99,997	EU11
9,95			
99,99	H13	99,999	EU12
99,995			EU13
99,999	H14		EU14
99,9995			

Protezione individuale

Le modalità di manipolazione delle sostanze sono riportate nelle relative schede di sicurezza.

Alla sezione 2 – Identificazione dei pericoli, sono riportate le indicazioni di pericolo (frasi H ex R) e i consigli di prudenza (frasi P ex S).

Alla sezione 8 – Controllo dell'esposizione / protezione individuale, sono riportati i riferimenti normativi, i valori limite di soglia e i valori di DNEL / DMEL (livelli derivati di non effetto). Sono riportate anche le specifiche protezioni previste per mani, pelle, occhi e vie respiratorie.

APPROFONDIMENTO

I **valori limite di soglia** (Threshold Limit Value ovvero "valore limite di soglia" o **TLV**) sono le concentrazioni ambientali delle sostanze chimiche aerodisperse al di sotto delle quali si ritiene che la maggior parte dei lavoratori possa rimanere esposta ripetutamente giorno dopo giorno, per una vita lavorativa, senza alcun effetto negativo per la salute.

I valori di TLV relativi alle varie sostanze vengono pubblicati ogni anno dall'associazione americana degli igienisti industriali (ACGIH), insieme agli Indici Biologici di Esposizione, e ripresi in Italia sotto l'autorizzazione della stessa ACGIH, dall'AIDII (Associazione Italiana degli Igienisti Industriali). Sono espressi solitamente in valori ponderali (mg/m³) o in valori volumetrici (parti per milione ppm) e vengono aggiornati nel tempo, con l'avanzare della ricerca scientifica nel settore dell'igiene del lavoro.

TLV-TWA (*time-weighted average*): esprime la concentrazione limite, calcolata come media ponderata nel tempo (8 ore/giorno; 40 ore settimanali), alla quale tutti i lavoratori possono essere esposti, giorno dopo giorno senza effetti avversi per la salute per tutta la vita lavorativa.

TLV-STEL (*short-term exposure limit*): è il valore massimo consentito per esposizioni brevi - non oltre 15 minuti - ed occasionali - non oltre quattro esposizioni nelle 24 ore, intervallate almeno ad un'ora di distanza l'una dall'altra. Il TLV-STEL è la concentrazione alla quale si ritiene che i lavoratori possano essere esposti per breve periodo senza che insorgano: irritazione, danno cronico o irreversibile ai tessuti, effetti tossici dose risposta, narcosi di grado sufficiente ad accrescere le probabilità di infortuni o di influire sulle capacità di mettersi in salvo o ridurre materialmente l'efficienza lavorativa. Il TLV-STEL non protegge necessariamente da questi effetti se viene superato il TLV-TWA. Il TLV-STEL non costituisce un limite di esposizione separato indipendente, ma piuttosto integra il TLV-TWA di una sostanza la cui azione tossica sia principalmente di natura cronica, qualora esistano effetti acuti riconosciuti

TLV-C (*ceiling*): concentrazione che non deve essere superata durante nessun momento dell'esposizione lavorativa. Si tratta di valori limite da applicare per le esposizioni istantanee, che non devono superare per alcuna ragione nel corso del turno di lavoro. L'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) è del parere che i limite di concentrazione indicati per prevenire irritazione non debbano essere considerati meno vincolanti di quelli raccomandati per evitare l'insorgenza di un danno per la salute. Sono sempre più frequenti le constatazioni che l'azione irritativa può avviare, facilitare o accelerare un danno per la salute attraverso l'interazione con altri agenti chimici o biologici o attraverso altri meccanismi.

In generale si considera:

- 1) rischio lieve: quando la concentrazione aerea < $\frac{1}{4}$ della TLV
- 2) rischio controllato: quando la concentrazione aerea > $\frac{1}{4}$ e < $\frac{3}{4}$ della TLV
- 3) rischio potenziale: quando la concentrazione aerea < $\frac{3}{4}$ e < della TLV
- 4) rischio non consentito: quando la concentrazione aerea > della TLV

Inoltre alla sezione 11 – Informazioni tossicologiche troviamo il valore di LD₅₀ e la relativa classe di tossicità o STA (tossicità acuta). La legislazione vigente riporta 4 classi:

- Acutee Tox. 1 - STA: orale < 5mg/Kg; cutanea < 50mg/Kg; gas < 100ppm/V; vapori < 0,5mg/L; Polv.e nebbie < 0,05mg/L
- Acutee Tox. 2 - STA: orale 5/50mg/Kg; cutanea 50/200mg/Kg; gas 100/500ppm/V; vapori 0,5/2mg/L; Polv.e nebbie 0,05/0,5mg/L
- Acutee Tox. 3 - STA: orale 50/300mg/Kg; cutanea 200/1.000mg/Kg; gas 500/2.500ppm/V; vapori 2/10mg/L; Polv.e nebbie 0,5/1mg/L
- Acutee Tox. 4 - STA: orale 300/2.000mg/Kg; cutanea 1.000/2.000mg/Kg; gas 2.500/20.000ppm/V; vapori 10/20mg/L; Polv.e nebbie 1/5mg/L

APPROFONDIMENTO

Per STA si intende s'intende la proprietà di una sostanza o miscela di produrre effetti nocivi che si manifestano in seguito alla somministrazione per via orale o cutanea di una dose unica o di più dosi ripartite nell'arco di 24 ore, o in seguito ad una esposizione per inalazione. La classe di pericolo «Tossicità acuta» è differenziata in: tossicità acuta per via orale; tossicità acuta per via cutanea; tossicità acuta per inalazione. I valori di tossicità acuta sono espressi in valori (approssimati) di LD₅₀ (orale, cutanea) o LC₅₀ (inalazione) o in stime della tossicità acuta (STA). La specie animale raccomandata per la valutazione della tossicità acuta per via orale o per inalazione è il ratto; per la tossicità acuta per via cutanea, il ratto o il coniglio. Se esistono dati sperimentali sulla tossicità acuta riferiti a più specie animali, per la scelta del valore LD₅₀ più appropriato tra i risultati di prove valide e correttamente eseguite si ricorre al giudizio scientifico.

Nella stessa sezione si trova anche un riepilogo della tossicità orale, cutanea, oculare, inalatoria, riproduttiva, etc.

In base alla scheda di sicurezza il direttore del laboratorio stabilisce per ogni sostanza le modalità di manipolazione.

SUGGERIMENTO

E' buona norma che, per ogni sostanza presente in laboratorio, questi valori e le tipologie di protezioni individuali vengano trascritti nel SW per una rapida consultazione.

Cappe a flusso laminare: la cappa a flusso laminare è utilizzata per creare una zona di aria confinata a contaminazione controllata. La sterilizzazione dell'aria all'interno della cappa viene realizzata forzandone il passaggio attraverso filtri HEPA: tali filtri sono realizzati in micro fibra di vetro che garantiscono aria "pura" a valori molto vicini al 100% .

Le cappe di laboratorio biologico si dividono in:

- Cappa di classe I
- Cappa di classe II
- Cappa di classe III

Le cappe di prima classe hanno la funzione di proteggere l'operatore e non il campione. Sono sistemi aspiranti con la finalità di proteggere l'operatore dalla tossicità inalatoria dal campione ma con conseguente possibile contaminazione dello stesso da parte dell'ambiente e dei materiali non sterili. L'aria è filtrata in uscita tramite filtri HEPA. Tali filtri, che sono definiti filtri assoluti, sono disposti in cima alla cappa e filtrando almeno il 99,995% delle particelle fino a 0,3 /0,1 micron,

restituiscono all'ambiente aria pura e sterile. Per tale ragione, se in perfetta efficienza, non necessitano di scarico esterno.

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

La cappa di classe terza è una cappa la cui funzione è quella di isolare completamente l'operatore dal campione che manipola e non esporlo a rischi di contagio con patogeni, virus e sostanze altamente tossiche.

Tale cappa è chiusa ed ermetica: l'operatore manipola gli agenti biologici tramite guanti fissi che lo isolano completamente. Le cappe di classe III filtrano l'aria sia in entrata che in uscita, tramite quattro filtri HEPA: l'aria in entrata è sterilizzata tramite un filtro posto sul retro. L'aria in uscita è sterile grazie al passaggio attraverso due filtri HEPA, assicurando all'ambiente interno una pressione negativa.

Le cappe a flusso laminare sono le attrezzature più comuni per creare ambienti di aria purificata. Possono essere posizionate in ambienti semplicemente confinati, creando un volume d'aria purificata, o essere inseriti in un ambiente di tipo A o B per creare un volume di aria adatto alle preparazioni in sterilità. Si distinguono fondamentalmente in due tipologie:

- Cappe a flusso orizzontale: il flusso, che parte dalla parete della cappa posta frontalmente alla sua apertura, viene direttamente indirizzato verso l'operatore. Questi tipi di cappe servono solo ad evitare contaminazioni del campione e a mantenere un ambiente sterile all'interno della cappa stessa, mentre non garantiscono alcuna protezione all'operatore che viene investito direttamente dal flusso di aria (potenzialmente contaminata) in uscita. Pertanto non si tratta di cappe di sicurezza, in quanto rischiose per l'operatore e l'ambiente, ma sono quelle che garantiscono meglio il campione, avvicinandosi alle performance di un isolatore. Sono meno costose rispetto alle cappe a flusso verticale e vengono utilizzate in attività di laboratorio dove il rischio per l'operatore è limitato (produzioni di farmaci che non hanno tossicità inalatoria, manipolazione di batteri non patogeni).



Cappa a flusso laminare sterile orizzontale

- **Cappe a flusso verticale:** generalmente, le cappe a flusso laminare verticale sono dotate di più filtri di cui almeno uno è un HEPA. Un motoventilatore superiore spinge l'aria attraverso un filtro principale da cui emerge un flusso laminare che investe il piano di lavoro. L'aria oltrepassa il piano di lavoro (di acciaio forato) e viene aspirata da un motoventilatore inferiore; l'aria viene spinta attraverso un secondo filtro nello spazio sovrastante il filtro principale. Il 30% dell'aria viene restituita all'esterno. Le cappe hanno uno schermo di vetro il quale è adottato per una maggior sicurezza dell'operatore. Proteggono il campione in maniera sufficiente ma minore rispetto alle cappe orizzontali ma nel contempo proteggono anche l'operatore. Come abbiamo precedentemente discusso, ne esistono vari tipi che filtrano in maniera più o meno efficiente l'aria che è venuta a contatto con il campione e che viene riciclata nell'ambiente e quindi respirata dall'operatore stesso. A secondo del livello di tossicità inalatoria del campione si deve scegliere il tipo di cappa verticale con il rifiltraggio dell'aria adatto.



Cappa a flusso laminare sterile verticale

Isolatori: sono delle cappe trasparenti completamente chiuse nelle quali le braccia degli operatori entrano attraverso dei guanti montati a tenuta ermetica sull'area anteriore.



Isolatore

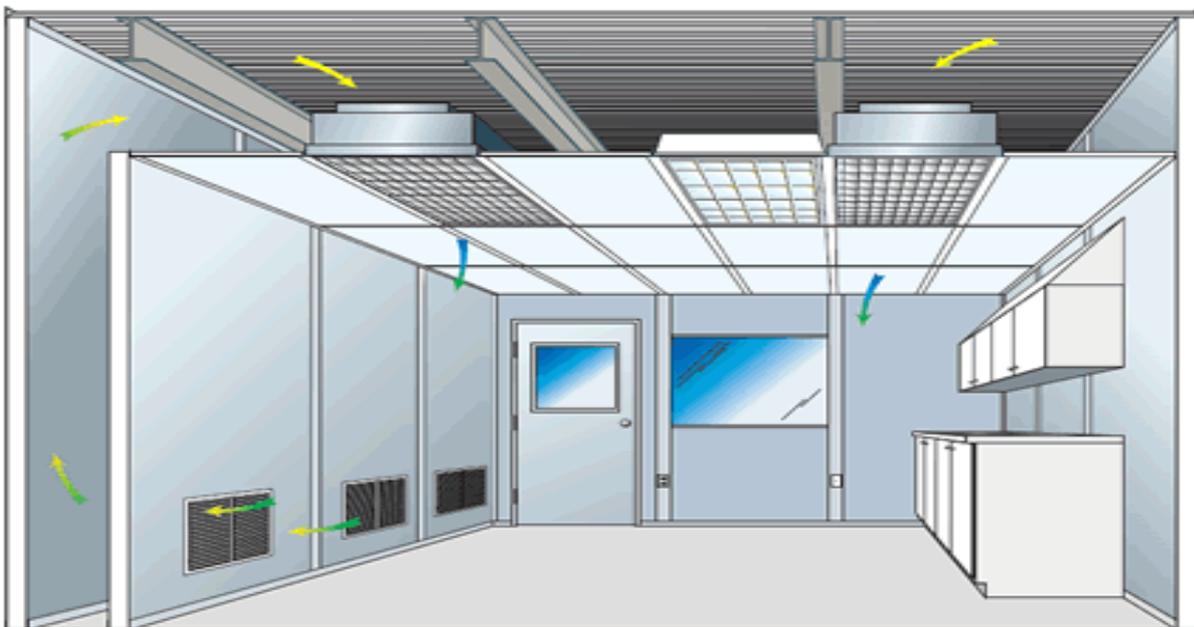
Vengono riempite insufflando all'interno aria o altri tipi di gas (es. azoto) sterilizzati mediante filtri. Generalmente, per sicurezza, vengono create all'interno pressioni positive rispetto all'esterno. Un manometro che misura la pressione all'interno segnala eventuali perdite di tenuta dell'attrezzatura. E' una maniera facile, economica e poco ingombrante di creare un ambiente di tipo A in un qualsiasi ambiente confinato, senza bisogno di creare ambienti filtro di tipo B. Il principale limite risiede nel fatto che i guanti, che necessariamente per sicurezza devono avere un certo spessore onde evitare lacerazioni durante il lavoro, non sono in grado di restituire una buona tattilità all'operatore.

CLEAN ROOM (AMBIENTI A CONTAMINAZIONE AEROPORTATA CONTROLLATA) :

Una camera bianca funziona in sostanza con il principio di ricircolare forzatamente l'aria super-filtrata in una stanza sigillata. Il sistema che provvede a questo è costituito da grandi ventilatori operanti a bassa velocità, che immettono nella stanza, attraverso il soffitto o le pareti, un flusso laminare di aria filtrata, attraverso filtri HEPA posizionati all'esterno, ed aspirata attraverso griglie poste sul pavimento o nelle pareti contrapposte. Nelle camere in cui è richiesta purezza dell'aria elevata o totale, l'accesso è consentito solo al personale adeguatamente addestrato.

Ci sono tre tipologie di clean room :

- Con flusso unidirezionale (LAF)
- Convenzionale o con flusso non unidirezionale
- Con flusso misto



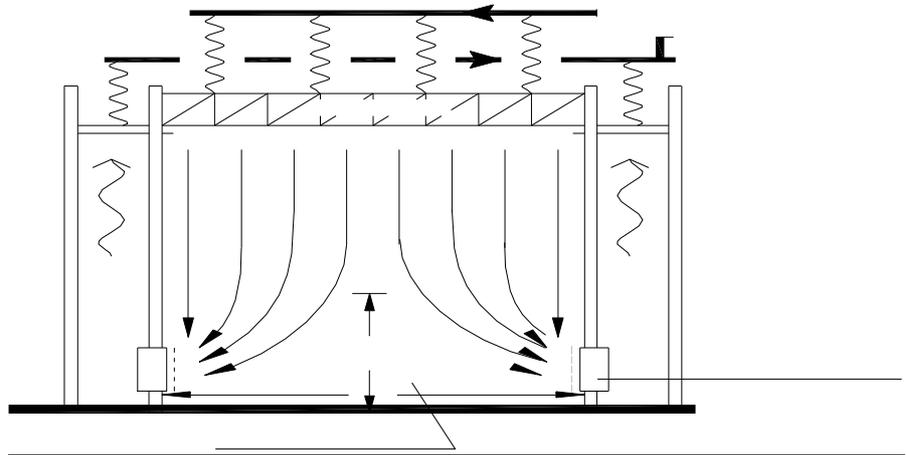
4.1. Flussi Laminari

Il **flusso unidirezionale** è caratterizzato dall'introduzione d'aria attraverso filtri HEPA o HULPA con una velocità uniforme pari a $0.45 \pm 20\%$ m/s.

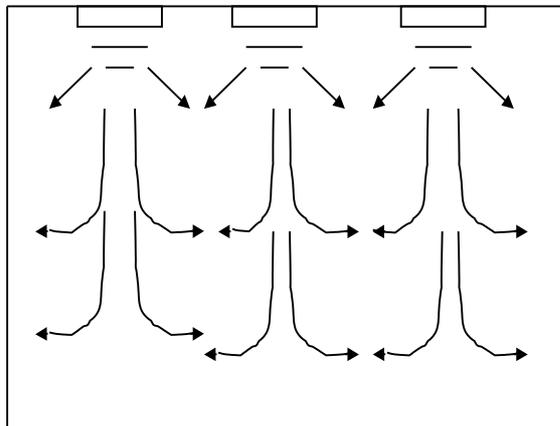
I flussi unidirezionali possono essere di due tipi :verticali (VLF) ed orizzontali (HLF). Il più utilizzato è il VLF in quanto riesce a diminuire la contaminazione che si crea per i moti vorticosi provocati da cose e persone.

I moti vorticosi caratterizzano le *zone di turbolenza*, le quali sono anche causate dalla posizione e larghezza del flusso laminare.

Le zone di turbolenza vanno evitate il più possibile in quanto possono portare a sacche di contaminazione locali.



In zone non particolarmente critiche vi è l'utilizzo di **flussi laminari non unidirezionali**, erogati da normali diffusori a soffitto che disperdono in modo uniforme i contaminanti presenti in un locale.



I **flussi misti** sono usati per ottimizzare i costi e garantire l'utilizzo di flussi non unidirezionali nei punti più critici, dove il prodotto è a contatto principalmente con l'ambiente. Inoltre, per evitare la contaminazione da un locale meno pulito ad uno più pulito, è utilizzato un sistema di sicurezza come barriera fisica esercitando una sovrappressione, con differenza di pressione di 10-15 Pa. Un altro aspetto molto importante delle clean room è l'impianto di ventilazione, per mantenere in un range la concentrazione di particolato e agenti biologici, per regolare la temperatura e l'umidità. I valori limiti della temperatura ed umidità sono calcolati prendendo in considerazione il comfort delle persone e valori che non aiutino la crescita microbica. La temperatura di immissione d'aria varia in base al flusso utilizzato, nel caso del flusso unidirezionale T_{max} 3-4 C°, mentre per il flusso turbolento una T_{max} 10-11 C°. Di norma in una camera bianca i valori rispettati sono : T_{min} 18-19 C° , T_{max} 22-24 C° , UR :30-40 %.

Monitoraggio delle aree a contaminazione aeroportata controllata :

Il monitoraggio microbiologico ambientale viene eseguito effettuando controlli dell'aria e delle superfici di lavoro. In tutti i tipi di campionamento, le cellule microbiche sospese nell'aria o presenti sulle superfici vengono prelevate e fatte moltiplicare su idonei terreni di coltura, in modo da poterle poi quantificare ed eventualmente identificare.

I metodi di monitoraggio che prevedono la conta batterica su terreno solido e liquido sono in grado di rilevare solo la frazione microbica vitale metabolicamente attiva e, di conseguenza, in grado di riprodursi e di formare colonie visibili. E' necessario, a tal proposito, ricordare che la dispersione dei microrganismi nell'aria e le stesse tecniche di campionamento, possono determinare una condizione di stress per i microrganismi stessi, compromettendone la vitalità e la capacità di riprodursi su un terreno di coltura

Il monitoraggio può riguardare l'aspetto:

- 1) *microbiologico*
- 2) *particolare*
- 3) *velocità dei flussi laminari*

1) Monitoraggio microbiologico

Un volume preciso di aria viene aspirata attraverso una pistola e va a contatto con una piastra di coltura inserita all'interno di essa. In seguito la piastra viene estratta e messa in termostato . 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.

Il controllo prevede almeno la misurazione della CMAT (conta batterica aerobica) e della CFLT (conta di muffe e lieviti). I valori da rispettare dipendono dal tipo di forma farmaceutica.



2) Monitoraggio particellare

Lo si effettua con i contatori di particelle. Sono macchine munite di una pompa di aspirazione e di un laser in grado di individuare le particelle, di numerarle e suddividerle in base al loro diametro.



Un software da in tempo reale all'operatore le condizioni di contaminazione aeroportata dell'ambiente. Sono molto adoperate in industria e costituiscono "gli occhi" degli operatori sulla qualità della contaminazione dell'aria in tempo reale. Ovviamente, a differenza dei controlli microbiologici su piastra, non ci danno alcuna informazione sulla natura delle particelle. I batteri e i miceti vanno da dimensioni minime di 0,25 micron a 10-20 micron ma in aria viaggiano solo se "appoggiate" su particelle inerti e quindi si ritiene che sia impossibile trovare un microrganismo sospeso in aria la cui somma di volume con la particella che lo trasporta esprima un diametro inferiore ai 5 micron. In farmaceutica i valori dei diametri particellari che vengono presi in considerazione per il controllo della contaminazione aeroportata sono essenzialmente due: 0,5 e 5 micron. Un campionamento in cui vi è assenza di particelle da 5 micron viene considerato virtualmente sterile. Il discorso si può complicare quando il controllo riguarda lavorazioni nelle quali si producono evaporazioni e particelle in sospensione. In tal caso il processo di controllo deve essere, a monte, validato sia da un punto di vista particellare che microbiologico. Ai contatori di particelle vengono connesse sonde isocinetiche che vengono posizionate nei punti strategici, ovvero quelli dove si ritiene possano avvenire turbolenze. Nelle industrie, tutti i contatori di particelle che monitorano la contaminazione aeroportata delle aree confinate, sono collegati in rete con un computer centrale adibito al controllo particellare, delle temperature, dell'umidità relativa, delle pressioni ambientali e delle velocità dei flussi laminari. Nei laboratori più piccoli, come quelli presenti in alcune farmacie territoriali e ospedaliere, tali rilevatori sono separati fra loro e tutti dentro l'ambiente controllato. L'operatore prima di iniziare l'attività, verifica l'idoneità dei valori e fa attenzione agli allarmi acustici impostati preventivamente sulle macchine (a secondo il grado di purezza che si vuole ottenere). Riportiamo un esempio di campionamento particellare effettuato con un contaparticelle.

Instrument Model SOLAIR 3100
 Instrument Serial # : 090604004
 Downloaded On : 07/06/2012 18:34.20
 Particle Data : Differential
 Data Duration 07/06/2012 17:56.15 to 07/06/2012 18:31.15

Timestamp	Location (Number)	Location (Name)	0,5 micron (Counts)	5,0 micron (Counts)	0,5 micron (p/m ³)	5,0 micron (p/m ³)	Sample Time (s)	Sample Volume (L)
17.56.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
18.01.15	2	G_A_OPER	1	0	7,1	0,0	300	141,6
18.06.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
18.11.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
18.16.15	2	G_A_OPER	29	0	204,8	0,0	300	141,6
18.21.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
18.26.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
18.31.15	2	G_A_OPER	0	0	0,0	0,0	300	141,6
Average			3,8	0,0	26,5	0,0	300,0	141,6
Maximum			29	0	204,8	0,0	300	141,6
Minimum			0	0	0,0	0,0	300	141,6

Questo è un esempio di controllo effettuato dal contatore di particelle durante una produzione in sterilità. I campionamenti sono 8 e vengono effettuati ogni 5 minuti. Ogni campionamento si riferisce a 141,6 litri di aria per un totale di 1.132,8 litri. Le particelle vengono contate in due modalità:

- 1) *Row (modalità cruda)*: il numero effettivo di particelle rilevate dalla sonda
- 2) *Sommatoria*: il numero row viene normalizzato a secondo del grado di purezza in cui si lavora. Nell'esempio riportato siamo in grado A e quindi il valore va normalizzato a 1.000 litri / 1 m³.

Si può notare che nel 5° campionamento (l'unico nel quale il contatore di particelle ha rilevato qualche cosa) abbiamo un valore row di 29 particelle da 0,5 micron in 5 minuti. La macchina, che è regolata per controllare un ambiente di grado A, normalizza il dato row alla quantità di particelle che in una tale contaminazione si avrebbe su 1 m³ ovvero 204.8 particelle, valore ben al di sotto del valore massimo previsto dalle GMP (3.520). Nei controlli particellari, ma anche microbiologici, si vede quanto sia importante il volume di aria da controllare che è sempre in relazione all'area dell'ambiente e al grado di purezza che si vuole validare. Anche il numero di campionamenti (numero di sonde isocinetiche) dipende da questi fattori.

3) Monitoraggio della velocità dei flussi laminari

Avviene attraverso l'uso di misuratori chiamati anemometri. Si adoperano per controllare nel tempo l'efficienza delle aspirazioni ed immissioni di aria e quindi servono per monitorare sia semplici aspiratori per polveri e aspiratori per il ricambio dell'aria del laboratorio sia per i flussi laminari sterili delle cappe. I più precisi sono quelli corredati di sonda a filo caldo.



Per il monitoraggio degli aspiratori per polveri basta avere un apparecchio con sensibilità alla prima cifra decimale, per il controllo delle cappe sterili serve una maggiore precisione, alla seconda cifra decimale.

Fra le due tipologie di apparecchi c'è una notevole differenza di prezzo.

RIEPILOGANDO:

Nell'attività di laboratorio di farmacia, il direttore responsabile si assicura che le operazioni di produzione vengano effettuate sempre in **aria confinata** e quindi in aree chiuse e delimitate rispetto ad altri ambienti, che non abbiano mai contatto diretto con l'aria esterna e che non siano attraversate da persone non inerenti alle attività specifiche. Il ricambio dell'aria confinata deve avvenire mediante estrattori elettrici previa filtrazione e deve essere calcolata in base al numero di persone che vi lavorano all'interno. Per quanto riguarda le preparazioni di prodotti non sterili, l'applicazione di semplici misure igieniche personali e dei protocolli di sanitizzazione degli ambienti fa sì che i parametri di massima contaminazione ammessa vengano rispettati. La sicurezza degli operatori viene assicurata da adeguati impianti di aspirazione per le polveri e i gas che si possono sprigionare nell'ambiente durante le lavorazioni. Le sostanze tossiche devono essere manipolate mediante impianti di aspirazione specifici (cappe aspiranti per sostanze tossiche) e indossando le protezioni individuali previste nelle relative schede di sicurezza. I prodotti sterili vanno manipolati in specifici ambienti come previsto dalle NBP che rimandano alla norma GMP. Il monitoraggio microbiologico periodico, previsto dalle norme HACCP, certifica l'idoneità degli ambienti. Per

gli ambienti in sterilità il monitoraggio della contaminazione aeroportata durante le fasi di processo, costituisce un punto cruciale e irrinunciabile. Fattore di grande importanza è l'addestramento del personale all'uso delle protezioni individuali: camici, calzari, cuffie, mascherine, occhiali, etc. la cui tipologia viene identificata dal direttore del laboratorio in base alle sostanze manipolate e al grado di contaminazione aeroportata previsto.