



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo

**Convalida dei disinfettanti per procedure di *cleaning*
presso un’officina farmaceutica accademica**

Relatore:

Professore Antonio Torroni

Correlatore:

Dottoressa Patrizia Comoli

Tesi Sperimentale di
Sonia Granziero

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP).....	1
1.1.1 Normative di riferimento per gli ATMP.....	2
1.1.2 Good Manufacturing Practices (GMP).....	4
1.1.3 L'assicurazione e il controllo qualità nell'ambito degli ATMP.....	6
1.1.4 Prodotti Medicinali per Terapia Cellulare (PMTTC).....	7
1.2 Operazioni di pulizia presso le officine di produzione di ATMP (<i>Cleaning</i>).....	8
1.2.1 Procedure del <i>Cleaning</i>	9
1.2.2 Disinfettanti.....	12
1.2.3 Monitoraggio ambientale.....	15
1.3 Convalida delle procedure di <i>Cleaning</i>.....	18
1.3.1 Microrganismi resistenti.....	22
1.3.2 Convalida disinfettante.....	23
 2. SCOPO DEL LAVORO.....	 26
 3. MATERIALI E METODI.....	 28
3.1 Monitoraggio della contaminazione ambientale.....	28
3.2 Gestione ceppi contaminati.....	33
3.2.1 Isolamento e identificazione dei ceppi.....	35
3.2.2 Conservazione dei ceppi.....	38
3.2.3 Ricostituzione dei ceppi.....	40
3.3 Operazioni di pulizia all'interno della <i>Cell Factory</i>.....	42
3.3.1 Sanitizzanti impiegati presso la <i>Cell Factory</i>	44
3.3.2 <i>Cleaning</i> dei locali.....	45
3.3.3 <i>Cleaning</i> delle apparecchiature e degli strumenti.....	47
3.4 Convalida disinfettante.....	49
3.4.1 Scelta dei microrganismi e delle superfici da testare.....	51
3.4.2 Preparazione delle sospensioni ottenute dal ceppo di partenza.....	52

4. RISULTATI.....	54
4.1 Valutazione della crescita microbica in assenza del disinfettante.....	55
4.2 Efficacia diretta del disinfettante <i>Klercide Low Residue Quat</i>	56
4.3 Attività del disinfettante in presenza di un agente neutralizzante (<i>Tween 20</i>).....	57
4.4 Attività del disinfettante in presenza di un agente interferente (albumina sierica umana).....	59
 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....	 61
 6. BIBLIOGRAFIA.....	 66

ABSTRACT

I Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP) rappresentano una tra le innovazioni più significativa della medicina moderna, in quanto sono in grado di offrire potenziali soluzioni per malattie complesse, proponendo nuove opzioni terapeutiche per persone con scarse possibilità di trattamento. Questi farmaci, costituiti da cellule vitali, sono caratterizzati da processi produttivi complessi, da una elevata variabilità biologica della materia prima (cellule e tessuti di origine umana), da tempistiche di produzione e rilascio estremamente ridotte rispetto ai farmaci convenzionali, e dall'impossibilità di eseguire una sterilizzazione terminale del prodotto. In assenza di un processo di sterilizzazione terminale, l'intero processo produttivo si fonda sulla capacità delle aree classificate di mantenere requisiti microbiologici stringenti, e tale capacità dipende in larga misura dall'efficacia dimostrata dei prodotti sanificanti impiegati per il trattamento di superfici, attrezzature e componenti critici.

Il requisito fondamentale che accompagna tutto il processo produttivo dei farmaci, dalla ricezione della materia prima fino al rilascio del prodotto finito, è il controllo della contaminazione microbiologica, che è condotta tenendo in considerazione molteplici fattori, tra cui: le caratteristiche della struttura e delle aree di produzione, le fasi del processo di produzione, i flussi del personale e dei materiali, le probabilità di contaminazione, l'identificazione dei punti di campionamento, le procedure di pulizia e sanificazione e, in particolare, l'efficacia delle procedure di pulizia e disinfezione delle aree di produzione e delle attrezzature. Uno degli elementi cardine del sistema di controllo della contaminazione, infatti, è rappresentato dalle procedure di *cleaning*, finalizzate alla rimozione di residui di processo, particolato e carica microbica dalle superfici delle aree classificate di produzione e dalle apparecchiature critiche. L'efficacia di tali procedure dipende in maniera determinante dalla corretta selezione, qualificazione e convalida dei disinfettanti impiegati, che devono essere in grado di garantire un adeguato spettro di attività antimicrobica nelle reali condizioni di utilizzo previste dal laboratorio.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in questo contesto, in quanto si è focalizzato sulla convalida dei disinfettanti presso la *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. In particolare, è stato convalidato l'agente disinfettante *Klercide Low Residue Quat*, da sostituire al biocida *Klercide Quat/Biguanide*, utilizzato negli schemi di rotazione dei disinfettanti e non più disponibile in commercio. A questo scopo, si è proceduto a dimostrare l'efficacia microbiologica e l'idoneità operativa, garantendo il rispetto dei requisiti normativi previsti dalle Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*).

Lo studio ha previsto la determinazione dell'attività antimicrobica del nuovo disinfettante nei confronti di un pannello di microrganismi selezionati, in parte determinati dalla farmacopea, in parte identificati da monitoraggio endogeno, applicato su cinque tipologie di superfici rappresentative dell'ambiente di produzione, in presenza sia di un agente neutralizzante (*Tween 20*) sia di una sostanza interferente (albumina sierica umana), a simulare condizioni di sporco organico. Il requisito, da norme ISO, è l'abbattimento della carica microbica di almeno 5 log₁₀ per l'attività battericida e di 4 log₁₀ per l'attività fungicida/levuricida.

I risultati ottenuti hanno mostrato una riduzione della carica microbica superiore a 5 log₁₀ per i ceppi batterici e superiore a 4 log₁₀ per i ceppi fungini, valori che risultano ampiamente in linea con le aspettative regolatorie e con le prestazioni richieste a un prodotto destinato a sostituire un biocida già qualificato.

Nel complesso, i risultati degli esperimenti di tesi evidenziano come lo studio di convalida presentato risulta coerente con gli standard di riferimento del settore, e pienamente adeguato a supportare la decisione di integrare il *Klercide Low Residue Quat* come sanitizzante del programma di *cleaning* della *Cell Factory*. L'analisi dei risultati ha confermato l'idoneità del nuovo sanitizzante a garantire un'efficacia quantomeno equivalente a quella del prodotto sostituito, con il vantaggio aggiuntivo di un minor impatto residuo sulle superfici trattate. Tale idoneità risulta ulteriormente rafforzata dal fatto che il *Klercide Low Residue Quat* non opera in isolamento, bensì all'interno di un programma di rotazione strutturato che risulta pienamente allineato alle aspettative dell'*Annex 1* dell'*EudraLex* Volume 4 in tema di gestione robusta e diversificata dei sanitizzanti nelle aree classificate destinate alla produzione di ATMP.

1 INTRODUZIONE

1.1 Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP)

Una tra le innovazioni più significativa della medicina moderna è rappresentata da una categoria di farmaci, ovvero, i Medicinali per Terapie Avanzate (*Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP*). [1]

Questi medicinali sono in grado di offrire potenziali soluzioni per malattie complesse, proponendo nuove opzioni terapeutiche per persone con scarse possibilità di trattamento.

I medicinali per terapie avanzate si differenziano dai farmaci tradizionali, poiché sono in grado di agire direttamente sui meccanismi genetici o cellulari che stanno alla base della malattia con conseguente impatto duraturo sulla salute del paziente. [2]

Gli ATMP agiscono sfruttando prodotti biologici complessi per ripristinare funzioni assenti/danneggiate o sostituire tessuti o organi danneggiati, e possono essere classificati, in base alla loro complessità biologica e tecnologica, in quattro gruppi principali:

1. Medicinali di terapia genica: sono farmaci biologici che contengono un acido nucleico ricombinante in grado di regolare, riparare, sostituire, aggiungere o eliminare una sequenza genica, con l'obiettivo di determinare un effetto terapeutico, preventivo o diagnostico correlato.
Nel caso di patologie ereditarie causate da un gene assente o difettoso, l'approccio genico consiste nel trasferimento nelle cellule del paziente di una copia funzionale del gene stesso.
2. Medicinali di terapia cellulare somatica: sono farmaci che comprendono cellule o tessuti che possono avere origine autologa (prelevati dal paziente stesso), allogenica (prelevati da un donatore sano) o xenogenica (prelevati da una specie animale diversa dall'uomo) e in seguito manipolati in modo sostanziale al fine di modificarne le caratteristiche biologiche, le funzioni fisiologiche o le caratteristiche strutturali. L'obiettivo clinico di questi farmaci è la cura, la prevenzione e la diagnosi delle malattie.
3. Medicinali di ingegneria tissutale: sono farmaci a base di cellule o tessuti soggetti ad un significativo processo di manipolazione, con l'obiettivo principale di riparare, rigenerare o sostituire tessuti umani.

4. Medicinali per terapie avanzate combinate: si definiscono tali in quanto integrano all'interno del prodotto a base cellulare o tissutale uno o più dispositivi medici, i quali costituiscono parte integrante del medicinale stesso. [3]

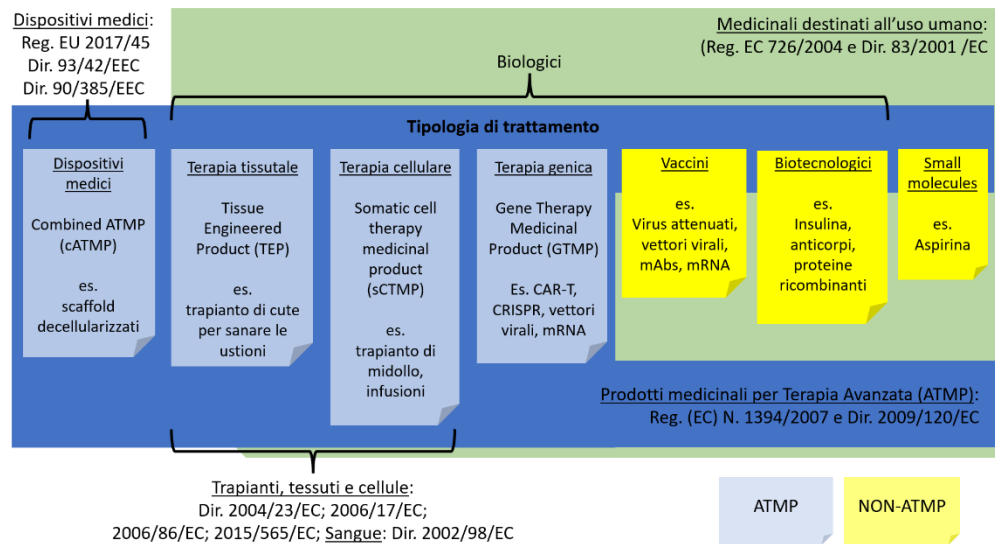


Figura 1: classificazione delle categorie di ATMP.

1.1.1 Normative di riferimento per gli ATMP

La principale normativa di riferimento nel contesto degli ATMP è rappresentata dal regolamento CE 1394/2007 che costituisce il pilastro normativo fondamentale per i medicinali per terapie avanzate. Questo testo modifica e integra due normative chiave precedenti, che sono: la direttiva 2001/83 CE, che rappresentava il codice comunitario sui medicinali per uso umano, e il regolamento CE 726/2004 che, invece, definiva le procedure dell'Unione Europea per l'autorizzazione e la farmacovigilanza dei medicinali per uso umano e veterinario e istituisce l'Agenzia Europea per i medicinali (*European Medicines Agency*, EMA).

Di fondamentale importanza, inoltre, è la direttiva 2009/120/CE che ha permesso di modificare la direttiva 2001/83/CE, aggiornando e introducendo le definizioni precise e i requisiti scientifici e tecnici mirati per i medicinali di terapia genica, i medicinali di terapia cellulare somatica, i medicinali di ingegneria tissutale e, infine, i medicinali per terapie avanzate combinate.

In Europa, la produzione di farmaci è normata dall'EMA attraverso una serie di documenti, inclusi nell'*EudraLex* volume 4 [3]. Per facilitarne la traslazione agli ATMP, che hanno

caratteristiche biologiche particolari, trattandosi di cellule vitali, il 22 maggio 2018 è entrata in vigore la linea guida: *Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products*, che sarà descritta nel dettaglio nel prossimo capitolo. [4]

Un altro aspetto fondamentale è l'approvazione commerciale degli ATMP e quindi, l'autorizzazione all'immissione in commercio. Quest'ultima deve avvenire obbligatoriamente attraverso la procedura centralizzata Europea di autorizzazione all'immissione in commercio. Nonostante le tempistiche e le modalità di valutazione scientifica e tecnica della documentazione che viene presentata dalle aziende farmaceutiche siano le stesse che vengono utilizzate per i farmaci tradizionali, nel caso dei Medicinali per Terapie Avanzate al ruolo del Comitato per i Medicinali per uso umano (*Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP) si affianca quello del Comitato per le Terapie Avanzate (*Committee for Advanced Therapies*, CAT). Questo perché gli ATMP richiedono delle competenze specifiche a causa della loro complessità.

Così come per qualsiasi medicinale, anche lo sviluppo e la sperimentazione dei Medicinali per Terapie Avanzate devono seguire standard rigorosi al fine di garantirne la sicurezza e la conformità. A tal proposito deve essere rispettata la Direttiva 2001/20/CE, relativa alle norme sulla Buona Pratica Clinica (*Good Clinical Practices*, GCP) e il regolamento 536/2014, che ha in seguito sostituito la Direttiva 2001/20/CE, andando ad introdurre norme specifiche per la sperimentazione clinica di farmaci ad uso umano, tenendo conto della loro complessità biologica. [5]

Il Comitato per le Terapie Avanzate (*Committee for Advanced Therapies*, CAT) è stato istituito in base al regolamento CE 1831/2003, in riferimento agli ATMP, ed è costituito da rappresentanti di ciascun Stato Membro dell'Unione Europea, da alcuni membri del Comitato per i Medicinali per uso umano e da esperti della professione medica e delle associazioni di pazienti con esperienza specifica nel settore. Il loro compito principale è quello di redigere un parere preliminare per ogni domanda di autorizzazione all'immissione in commercio degli ATMP, presentate da due Stati Membri incaricati, che verrà, in seguito, sottoposto al Comitato per i Medicinali per uso umano, al fine di emettere il parere definitivo. [3]

1.1.2 Good Manufacturing Practices (GMP)

All'interno dell'*EudraLex*, Volume 4, sono presenti le Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*) per gli ATMP, specifiche per i Medicinali per Terapie Avanzate: stabiliscono standard mirati per la gestione e il controllo delle materie prime biologiche, la tracciabilità totale del prodotto, la prevenzione e il monitoraggio delle contaminazioni ed infine la convalida dei processi produttivi e i criteri per il rilascio dei lotti. Questo documento è stato adottato dalla Commissione Europea nel 2017 ed è entrato in vigore a partire dal 2018 [4]

L'aspetto principale delle GMP per ATMP, che differisce dalle GMP per i farmaci di origine chimica, è rappresentato da quella che è definita come *quality by design* (QbD), ovvero un approccio sistematico allo sviluppo e alla produzione, basato sulla scienza e sulla valutazione dei rischi. A differenza dei farmaci tradizionali, caratterizzati da una sintesi chimica altamente prevedibile, gli ATMP presentano un'estrema variabilità delle materie prime (ad esempio, l'aferesi derivata dal paziente o da un donatore), meccanismi biologici complessi e lotti di dimensioni ridottissime. L'implementazione del QbD in questo ambito sposta l'attenzione dai test sul prodotto finale, spesso impossibili da effettuare a causa del volume limitato dei lotti o della breve durata di conservazione del prodotto, verso una comprensione approfondita del processo e un solido controllo in linea.

Poiché gli ATMP vengono spesso prodotti in lotti destinati a un singolo trattamento, i tradizionali test di rilascio distruttivi presentano notevoli limitazioni. Una strategia di controllo QbD si basa in larga misura sulla *Process Analytical Technology* (PAT) per monitorare e regolare il processo di produzione in tempo reale:

- *Monitoraggio continuo non distruttivo*: implementazione di strumenti PAT in linea (inline o online), per verificare continuamente la densità cellulare, la vitalità e i metaboliti senza consumare il prodotto.
- *Sistemi chiusi e automatizzati*: utilizzo di bioreattori automatizzati e sistemi di lavorazione fluidica chiusi. L'automazione riduce al minimo gli errori di manipolazione umana e i rischi di contaminazione, consentendo una gestione automatica e rigorosa dello "spazio di progettazione" da parte del software.
- *Controllo adattivo / Regolazioni in tempo reale*: se il materiale di partenza di un paziente o donatore presenta una conta cellulare inferiore al valore target ottimale, la strategia di controllo automatizzata si adatta regolando un parametro critico di processo — ad

esempio allungando la fase di espansione del bioreattore o modulando il regime di alimentazione — per riportare in modo sicuro la resa cellulare finale entro i limiti accettabili predefiniti.

- *Protocolli di rilascio in deroga*: per gli ATMP con durata di conservazione estremamente breve che devono essere somministrati immediatamente dopo la produzione, la strategia di controllo integra metodi rapidi di screening microbico (ad es. test automatizzati di sterilità rapida) per giustificare il rilascio in deroga in attesa del completamento delle validazioni a lungo termine della coltura. Inoltre, è ammesso il rilascio anche in presenza di controlli qualità “fuori specifica”, previa analisi del rischio da parte del produttore e del medico utilizzatore, proprio per la natura paziente-dedicata del farmaco cellulare.

Uno degli aspetti cardine delle GMP applicate ai Medicinali per Terapie Avanzate è rappresentato dalla gestione delle materie prime, le quali comprendono cellule, tessuti, vettori virali, sieri e altre componenti biologiche. [5] Trattandosi di materie prime che non possono essere sterilizzate terminalmente, è essenziale garantire che i tessuti e le colture cellulari siano manipolate in condizioni asettiche, includendo materiali, reagenti e strumentazioni sterili [5]; inoltre, le operazioni di lavorazione devono essere svolte all'interno di ambienti controllati, ideati per ridurre al minimo il rischio di contaminazione microbiologica e particellare [5] [6]. Nello specifico la manipolazione degli ATMP avviene all'interno di ambienti di classe A, che comprendono, ad esempio, cappe a flusso laminare, a loro volta posti in aree di classe B. Sono inoltre, presenti ambienti di classe C e classe D.

I locali di produzione devono garantire la sterilità dell'ambiente in lavorazione, proprio per questo devono essere provvisti di strutture ed impianti specifici, tra cui l'utilizzo di sistemi di ventilazione HVAC (*Heat, Ventilation and Air Conditioning*) e UTA (Unità di Trattamento Aria) dotati di filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air filter*), i quali assicurano idonee condizioni ambientali, tenute sotto controllo dal punto di vista della pulizia dell'aria, dell'umidità e della temperatura. Infine, è essenziale mantenere opportuni differenziali di pressione tra i diversi locali, evitando così l'ingresso di contaminati provenienti dalle aree con minor grado di pulizia. [6] [7]

Per quanto riguarda, invece, gli aspetti tecnici non coperti in modo esaustivo nell'EudraLex Volume 4 parte IV, si fa riferimento alle disposizioni dell'*Annex 1* e degli altri *Annex*/documenti ICH presenti nell'EudraLex Volume 4, alle norme ISO e alle linee guida dell'EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare*). [8] [9]

1.1.3 Assicurazione e controllo qualità nell'ambito degli ATMP

L'assicurazione qualità (Quality Assurance, QA) ed il controllo qualità (*Quality Control*, QC) costituiscono i pilastri del sistema di gestione della qualità degli ATMP, tuttavia, è fondamentale comprendere la differenza tra i due ruoli al fine di garantire una corretta gestione della qualità stessa.

Il controllo qualità è un sistema che si basa sull'individuazione delle problematiche e sull'osservazione e lo svolgimento di attività per verificare il rispetto dei requisiti specifici.

L'assicurazione qualità, invece, si basa sull'organizzazione di un sistema atto a prevenire ogni anomalia nell'ambito della sicurezza del prodotto. [10]

Inoltre, occorre definire che il controllo qualità ha lo scopo di verificare che i prodotti finali siano conformi alle specifiche e ai requisiti predefiniti sulla base della sicurezza, specificità, funzionalità ed identità e che vengano eseguite tutte le analisi necessarie affinché i prodotti non vengano usati o forniti fino a quando la loro qualità non risulta idonea [10][5]; mentre l'assicurazione qualità ha l'obiettivo di assicurare che tutti i processi utilizzati nella produzione del farmaco biologico rispettino gli standard qualitativi conformi ai requisiti normativi e agli standard GMP. [10]

Nell'ambito degli ATMP, i controlli di qualità sono fondamentali per poter valutare il risultato del processo e del prodotto che viene sviluppato. I controlli vengono effettuati in varie fasi del processo di produzione, i test di rilascio vengono eseguiti al fine di valutare la qualità del farmaco prima della distribuzione, inoltre questi test prima di essere utilizzati devono essere opportunamente convalidati. [11]

Ai fini di garantire la qualità del processo di produzione e degli ATMP è necessario procedere ai seguenti controlli:

1. Valutazione e approvazione delle specifiche, delle istruzioni di campionamento, dei metodi di analisi e ogni procedura legata al controllo qualità.
2. Approvazione delle condizioni operative per le analisi e per le prove affidate ai laboratori terzi.
3. Monitoraggio delle materie prime, dei materiali di partenza, dei dispositivi medici utilizzati nei medicinali per terapie avanzate combinati, dei materiali di imballaggio, dei prodotti intermedi, sfusi e finiti, includendo i provvedimenti di approvazione e di rifiuto.

4. Per i prodotti autologhi o allogenici, in caso di verifiche sulla compatibilità del donatore, è necessario che venga verificata la corrispondenza tra l'origine del materiale di partenza e il paziente ricevente, includendo la verifica delle informazioni di provenienza di cellule e tessuti.
5. Supervisione della gestione e della conservazione dei campioni di riferimento e dei materiali e prodotti, a seconda delle necessità.
6. Garantire che vengano eseguite tutte le analisi richieste e la successiva valutazione dei relativi registri e tracciati.
7. Assicurare il monitoraggio costante e continuo della stabilità dei prodotti.
8. Partecipare alle indagini relative alla qualità del prodotto.
9. Garantire la corretta compilazione e conservare tutta la documentazione relativa alla produzione e al rilascio del prodotto, includendo protocolli di convalida, rapporti di test e record dei lotti.
10. Nel caso delle attività citate al punto numero tre e al punto numero sei, è necessario attuare apposite procedure scritte.

Inoltre, il personale addetto al controllo qualità deve avere accesso alle aree di produzione, al fine di effettuare campionamenti e le necessarie indagini, deve garantire che i locali e le attrezzature dove sono svolte le operazioni di controllo qualità siano mantenuti in condizioni idonee. Infine, deve accertarsi che il personale, che opera sotto la sua responsabilità, sia idoneamente formato. [5]

1.1.4 Prodotti Medicinali per Terapia Cellulare somatica (PMTC)

Con il termine “Terapia Cellulare” ci si riferisce a un *biological medicinal product* ottenuto mediante diversi processi di “manipolazione sostanziale”, i quali consistono in un insieme di trattamenti volti ad attivare specifiche funzioni cellulari e/o a stimolarne la proliferazione. [12]

I Prodotti Medicinali per Terapia Cellulare Somatica sono costituiti da cellule umane vitali che agiscono direttamente come principio attivo. Il loro effetto terapeutico si esplica attraverso funzioni biologiche specifiche, quali la sostituzione di tessuti danneggiati, la rigenerazione tissutale, la modulazione della risposta immunitaria o la secrezione di fattori biologicamente attivi. [3] [7]

I PMTC si distinguono per la presenza di un'elevata eterogeneità intrinseca, dovuta all'origine, alla tipologia di cellule impiegate e alla complessità del prodotto finale. Questa categoria di farmaci comprende cellule staminali capaci di autorinnovamento (*self-renewal*), cellule progenitrici parzialmente differenziate (*committed*) o cellule completamente differenziate con funzioni fisiologiche specifiche. Tali componenti cellulari possono essere di natura autologa (prelevati dal paziente stesso) o allogenica (prelevati da un donatore sano), ed eventualmente possono essere sottoposti a modificazioni genetiche in modo tale da potenziarne l'efficacia o indirizzarne, in modo mirato, l'attività terapeutica. Inoltre, possono essere somministrate singolarmente oppure in associazione con biomolecole, sostanze chimiche o materiali che, se considerati autonomamente, rientrerebbero nella categoria dei dispositivi medici. [12] [13]

Data l'ampiezza e la rapida evoluzione del settore della medicina rigenerativa, l'impiego della terapia cellulare trova applicazione in un numero sempre maggiore di target terapeutici. [12]

1.2 Operazioni di pulizia presso le officine di produzione di ATMP (*Cleaning*)

Le procedure di *cleaning* rappresentano uno degli aspetti fondamentali del sistema di gestione del controllo qualità. Nell'ambito delle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*), le autorità regolatorie richiedono che tutti gli edifici utilizzati per la produzione, la lavorazione, il confezionamento e lo stoccaggio di un prodotto farmaceutico siano costantemente mantenuti in condizioni di totale pulizia e protetti da qualsiasi tipo di infestazione. Devono, inoltre, avere dimensioni, strutture e ubicazioni idonee al fine di garantire la facilità operativa, la pulizia e corretta manutenzione, incluso lo smaltimento di rifiuti e di scarti di lavorazione seguendo rigorosi standard igienici e di sicurezza.

Il percorso utilizzato per la rimozione dei rifiuti deve essere preso in considerazione prima ancora della pulizia stessa. A seconda del tipo di produzione (Terapie Cellulari Somatiche o Terapia Genica), che può richiedere, rispettivamente, un impianto a flusso multidirezionale o unidirezionale, sono distinte due tipologie di percorso: nel secondo caso, è molto importante che non vi sia commistione tra il percorso di uscita dei rifiuti ed il percorso di uscita del farmaco cellulare, del personale di produzione, dei reagenti e dei materiali: per questo il percorso è unidirezionale, e separato per le diverse funzioni (percorso sporco e percorso pulito).

A tal proposito, è obbligatorio redigere e seguire procedure scritte che definiscono le responsabilità igieniche e descrivono, in modo dettagliato, i piani, i metodi, i materiali e le attrezzature che vengono impiegate per la pulizia. Analogamente, devono essere formalizzati

protocolli per l'uso corretto di insetticidi, fungicidi, agenti fumiganti e prodotti per la sanificazione.

Queste procedure devono essere documentate e possono subire variazioni in base alla specifica collocazione del sito produttivo, ad esempio, se una struttura operante in regime GMP si trova all'interno di un campus universitario o di un ospedale, dovrà integrarsi con i regolamenti interni di tali enti. [14]

1.2.1 Procedure di cleaning

La pulizia viene definita come la rimozione, tramite l'uso di processi fisici o meccanici, di contaminazioni visibili e microscopiche, che possono essere causate dallo sporco, da residui di prodotto o sostanze estranee.

Le procedure di pulizia, di solito, richiedono l'utilizzo di detergenti o solventi in precise condizioni di PH, temperatura, tempo di contatto e concentrazione, inoltre, tali agenti chimici non devono danneggiare le superfici trattate. L'igienizzazione, invece, porta alla riduzione della carica microbiologica, principalmente attraverso l'uso di sostanze chimiche, sebbene anche il calore o un'azione meccanica energica come lo strofinamento possano essere efficaci. Quando parliamo di utilizzo di disinfettanti, occorre fare una distinzione tra igienizzazione, disinfezione e sterilizzazione:

- **Igienizzazione:** viene effettuato attraverso l'uso di igienizzanti, i quali devono garantire una riduzione batterica superiore al 99.9% e devono essere impiegati su superfici precedentemente pulite.
- **Disinfezione:** viene effettuata attraverso l'uso di disinfettanti, i quali devono garantire l'eliminazione del 100% dei batteri vegetativi, dei virus e dei funghi bersaglio. Anch'essi potrebbero richiedere una potenziale pre-pulizia della superficie.
- **Sterilizzazione:** viene effettuata attraverso l'uso di sterilizzanti e comporta l'abbattimento totale di tutti i microrganismi, incluse le endospore batteriche, anche in questo caso è necessaria una pulizia preliminare.

La valutazione dell'efficacia dei sanificanti dipende dal numero e dalla tipologia di microbi presenti, dalla natura del materiale che li ospita e dalla modalità d'uso dell'agente stesso.

Per la pulizia delle strutture possono essere utilizzati diversi strumenti e materiali, tra cui *mop* con frange monouso, secchi, spatole, flaconi spray e salviette disinfettanti pre-impregnati. Il materiale dovrà essere preventivamente sterile o, quantomeno, disinfettato.

Quando parliamo di procedure di *cleaning*, dobbiamo tenere in considerazione che possono essere utilizzati diversi metodi. Il metodo di pulizia può essere modulato e differenziato in funzione del tipo di superficie e delle attrezzature specifiche che vengono trattate. In particolare, possiamo identificare quattro metodologie principali:

1. Pavimenti, pareti e soffitti: la procedura prevede l'utilizzo di un panno sul quale viene applicata la soluzione disinfettante e che è applicato ad un supporto porta-panno in acciaio. Durante le operazioni di pulizia, il panno viene passato sulla superficie tirandolo verso di sé, una volta effettuata la prima passata, il panno va sollevato e riapplicato all'inizio della sezione precedente, lasciando una sovrapposizione di circa il 20%. Un aspetto fondamentale è il rispetto dei tempi di contatto dei diversi disinfettanti con le superfici, abitualmente indicati dal produttore.
2. Cabine a flusso laminare e biologiche: richiedono interventi di pulizia e sanificazione sia prima che dopo ogni singolo utilizzo e devono essere integrate con operazioni periodiche di manutenzione. Le superfici interne devono essere trattate, inizialmente, con alcol isopropilico al 70%, attraverso una stesura precisa, partendo dalla sezione posteriore superiore della cabina per poi avanzare progressivamente verso la zona anteriore inferiore. Durante questa fase è fondamentale evitare di bagnare il filtro HEPA o la griglia protettiva circostante. In seguito a questa fase, viene applicato un disinfettante formulato, attraverso l'impiego di flaconi spray abbinati a panni sterili (ad esempio *Texwipe*). Una volta decorso il tempo di contatto necessario all'azione del disinfettante, le superfici devono essere risciacquate utilizzando acqua sterile per iniezione oppure alcol isopropilico al 70%. Oltre alla pulizia quotidiana è raccomandata una pulizia completa della cabina, includendo la rimozione del piano di lavoro e la pulizia della zona sottostante e l'inserimento di un agente sporicida.
3. Piani di lavoro e mobili: la pulizia avviene attraverso l'uso di un disinfettante in flacone spray, applicato mediante panno monouso, oppure di salviette pre-imbevute. Durante la procedura di pulizia dei mobili è importante procedere dall'alto verso il basso, inoltre l'esterno deve essere pulito con maggiore frequenza rispetto all'interno. Ad essere inclusi nel programma di pulizia sono anche i telefoni, i piani di lavoro, le porte, le finestre (se presenti) ed i carrelli, prestando particolare attenzione alle ruote.

4. Attrezzature e strumenti: la procedura standard consiste nell'utilizzo di un disinfettante che viene spruzzato evitando le aree sensibili, nella pulizia attraverso salviettine sterili e nel risciacquo con acqua per uso farmaceutico o alcol isopropilico al 70%. Prima della pulizia è importante valutare se l'attrezzatura o lo strumento siano in grado di resistere all'agente disinfettante che dovrà essere utilizzato. [14]

Generalmente l'applicazione dei detergenti deve precedere quella dei disinfettanti; tuttavia, i disinfettanti di grado ospedaliero sono formulati con tensioattivi, disperdenti o chelanti che consentono di acquisire un livello moderato di pulizia e di abbattimento della carica microbica all'interno delle aree di produzione. [14]

L'efficacia di un disinfettante può essere valutata inoculando il microrganismo in esame direttamente su una superficie solida, la quale sarà coperta e incubata sia a temperatura ambiente, che a 37°C per favorirne la proliferazione. In seguito, la superficie stessa sarà trattata applicando la procedura di pulizia raccomandata per il prodotto in esame, prevedendo o meno la rimozione dei residui a seconda del protocollo adottato. Dopo aver effettuato questi passaggi, la superficie potrà essere campionata, attraverso l'impiego di piastre da contatto opportunamente selezionate, le quali saranno incubate e sottoposte a valutazione analitica. Ai fini della validazione del saggio risulta indispensabile l'inclusione di controlli di qualità, sia negativi che positivi.

Infine, un ulteriore elemento fondamentale delle procedure di *Cleaning* è rappresentato dalla vestizione del personale in ambienti classificati. L'ingresso nelle zone di produzione a contaminazione controllata è consentito solo tramite appositi locali di vestizione e zone filtro e avviene attraverso un percorso di vestizione graduale strutturato in base al grado di pulizia richiesto dall'area di arrivo. In ciascun passaggio, corrispondente ad un crescente grado di pulizia richiesto, gli operatori, in conformità con specifiche istruzioni operative, dovranno indossare l'abbigliamento sterile previsto, quali tuta, camice monouso, cuffia, mascherina, guanti, e copriscarpe al fine di ridurre al minimo la dispersione di particelle e contaminanti microbici [5] [15].

1.2.2 Disinfettanti

Le strutture dedicate alla produzione di ATMP operano in ambienti a contaminazione controllata (*cleanroom*) dove il rischio microbiologico rappresenta una delle principali minacce alla sicurezza del paziente e all'integrità del prodotto. A differenza dei farmaci convenzionali, gli ATMP sono spesso privi di una fase di sterilizzazione terminale, poiché i processi produttivi coinvolgono cellule vive o vettori virali che non tollerano trattamenti termici o radianti aggressivi. Questo rende la strategia di contaminazione *control*, e in particolare le procedure di sanitizzazione, un elemento cardine dell'assicurazione qualità.

Attualmente è disponibile un'ampia varietà di disinfettanti da impiegare nelle strutture ATMP, che possono essere classificati in base al meccanismo d'azione e allo spettro di attività, e la cui efficacia varia a seconda del tipo di microrganismo bersaglio. Possiamo trovare disinfettanti a base di alcool, aldeidi, disinfettanti anfotero, biguanide, miscele di biossido di cloro e composti quaternari ipocloriti, miscele di perossido di idrogeno e acido peracetico, composti fenolici e composti di ammonio quaternario (*tabella 1*).

Disinfettanti	Attività				Irritazione	Residui	Velocità
	Batteri	Funghi	Virus	Spore			
Alcool	Buona	Buona	Buona	Nessuna	Media	No	Si
Aldeidi	Buona	Buona	Buona	Buona	Molto alta	Si	No
Disinfettanti anfotero	Buona	Giusta	Giusta	Nessuna	Bassa	Si	Si
Biguanide	Buona	Giusta	Buona	Nessuna	Bassa	Si	Si
Miscele di biossido di cloro	Buona	Buona	Buona	Buona	Bassa	Si	Si
Composti quaternari ipocloriti	Buona	Buona	Buona	Giusta	Alta	Si	Si
Miscele di perossido di idrogeno/acido peracetico	Buona	Buona	Buona	Buona	Alta	No	Si
Composti fenolici	Buona	Buona	Giusta	Nessuna	Alta	Si	No
Composti di ammonio quaternario	Buona	Buona	Buona	Nessuna	Bassa	Si	Si

Tabella 1: Tipologie e proprietà dei disinfettanti.

Alcoli: etanolo (70-80% v/v) e isopropanolo sono ampiamente utilizzati per la disinfezione rapida di superfici e per la sanitizzazione delle mani (in combinazione con altri principi attivi). Agiscono per denaturazione proteica, hanno azione battericida e virucida moderata, ma sono privi di attività sporicida e con scarsa efficacia su virus non capsulati. Il loro impiego è limitato dalla rapida evaporazione, che ne riduce il tempo di contatto, e dall'incompatibilità con alcune plastiche.

Composti a base di cloro: ipoclorito di sodio e diossido di cloro offrono un ampio spettro d'azione, comprendente attività sporicida a concentrazioni adeguate. Sono agenti ossidanti fortemente reattivi, economici ed efficaci, ma corrosivi verso metalli e superfici sensibili, instabili nel tempo (richiedono controllo della concentrazione attiva) e irritanti per le vie respiratorie, il che ne richiede un impiego controllato in ambienti occupati.

Composti dell'ammonio quaternario (QAC): i QAC agiscono destabilizzando le membrane cellulari batteriche. Presentano buona attività battericida e fungicida, scarsa attività sporicida e limitata efficacia su virus non capsulati (es. norovirus). Sono generalmente meno corrosivi e più stabili rispetto ai cloroderivati, ma soggetti a fenomeni di resistenza microbica adattativa se usati come unico agente per periodi prolungati.

Perossido di idrogeno e acido peracetico: il perossido di idrogeno, in forma liquida o vaporizzata (VHP – *Vaporized Hydrogen Peroxide*), e le miscele con acido peracetico rappresentano oggi lo standard per la sanitizzazione ad ampio spettro con attività sporicida, particolarmente rilevante nelle aree Grade A/B. Il VHP consente inoltre la decontaminazione di intere camere bianche o isolatori senza intervento manuale diretto, riducendo il rischio di contaminazione da operatore.

Agenti sporicidi dedicati: formulazioni a base di acido peracetico stabilizzato o di perossido di idrogeno accelerato sono impiegate periodicamente (secondo un piano di rotazione) per garantire l'eliminazione di forme sporigene resistenti, in particolare di *Bacillus* spp., che gli altri agenti non riescono a neutralizzare in modo affidabile.

Le strutture ATMP presentano peculiarità che condizionano la scelta e l'impiego dei sanitizzanti:

- Compatibilità con materiali sensibili: superfici in acciaio inox, ma anche componenti in plastica di isolatori, cappe a flusso laminare e sistemi monouso (*single-use systems*), richiedono agenti non corrosivi e privi di residui che possano interferire con i processi cellulari.
- Assenza di sterilizzazione terminale: la sanitizzazione ambientale diventa l'unica barriera efficace contro la contaminazione microbica del prodotto, aumentando la criticità della corretta esecuzione delle procedure di *cleaning*.
- Rischio di residui tossici: poiché il prodotto finale è spesso una sospensione cellulare destinata alla somministrazione diretta al paziente, è essenziale evitare che residui di sanitizzante permangano su superfici a contatto diretto o indiretto con il prodotto, prevedendo fasi di risciacquo o l'uso di agenti a rapida degradazione (es. perossido di idrogeno, che si decompone in acqua e ossigeno).

- Classificazione degli ambienti: nelle aree *Grade A* e *B* (dove avvengono le manipolazioni più critiche, quali l'apertura di sistemi chiusi o la manipolazione di colture cellulari) è richiesto l'impiego di agenti sporicidi con maggiore frequenza rispetto alle aree *Grade C/D*.

I disinfettati impiegati in ambienti di classe A devono essere sterili e possono essere acquisiti direttamente dal fornitore. Inoltre, la stabilità dei prodotti deve essere determinata in base alle indicazioni del produttore o tramite validazione, al fine di garantirne l'uso prima della data di scadenza.

La selezione degli agenti sanitizzanti deve basarsi su un approccio documentato e *risk-based*, tenendo conto di:

- a) Spettro d'azione: capacità di coprire batteri vegetativi, funghi, spore e, ove rilevante, virus.
- b) Tempo di contatto richiesto: deve essere compatibile con le tempistiche operative reali della struttura.
- c) Compatibilità dei materiali: assenza di effetti corrosivi o degradativi su superfici, attrezzature e sistemi monouso.
- d) Tossicità residua e sicurezza dell'operatore: valutazione dei dispositivi di protezione individuale necessari e del rischio di esposizione.
- e) Stabilità della soluzione d'uso: tempo di validità dopo diluizione, condizioni di conservazione.
- f) Assenza di sviluppo di resistenza microbica: giustifica l'adozione di un piano di rotazione tra agenti con meccanismo d'azione differente.
- g) Dati di efficacia documentati: conformità a standard quali EN 13697 (attività battericida e fungicida su superfici), EN 14347 (attività sporicida) ed EN 14476 (attività virucida).

Una pratica raccomandata, e spesso richiesta dalle autorità regolatorie durante le ispezioni, consiste nell'adozione di un piano di rotazione tra almeno due sanitizzanti con meccanismo d'azione differente (ad esempio un QAC per la sanitizzazione di routine e un agente sporicida a base di acido peracetico o perossido di idrogeno a cadenza settimanale o secondo la criticità dell'area).

Questo approccio:

- riduce il rischio di selezione di ceppi microbici resistenti o tolleranti a un singolo principio attivo;
- garantisce una copertura periodica anche verso le forme sporigene, che rappresentano la sfida microbiologica più severa in ambito di contaminazione *control*;
- deve essere supportato da un razionale documentato nel piano di contaminazione *control* (*Contamination Control Strategy, CCS*), come richiesto dall'*Annex 1* revisionato.

L'efficacia di un sanizzante dipende non solo dalla sua formulazione chimica ma dalla correttezza della procedura applicativa, che deve includere:

- Preparazione della soluzione: rispetto delle diluizioni indicate dal produttore, utilizzo di acqua di qualità appropriata (es. acqua purificata) e verifica della data di scadenza della soluzione d'uso.
- Sequenza di pulizia: generalmente si procede dall'alto verso il basso e dalle aree meno critiche verso quelle più critiche, per evitare la ridistribuzione della contaminazione.
- Tecnica di applicazione: utilizzo di panni monouso o dedicati per area, evitando movimenti che ricontaminino le superfici già trattate; per superfici complesse (giunture, angoli) può essere necessario un doppio passaggio.
- Tempo di contatto: la superficie deve rimanere bagnata per il tempo minimo indicato dai dati di efficacia, condizione spesso disattesa nella pratica operativa e quindi oggetto di verifica in fase di formazione e audit interni.
- Frequenza: definita in base alla classificazione dell'area (*Grade A/B*: prima e dopo ogni sessione operativa; *Grade C/D*: secondo un piano calendarizzato) e agli eventi critici (es. dopo uno sversamento, dopo interventi di manutenzione).

1.2.3 Monitoraggio ambientale

Le condizioni ambientali, dal punto di vista microbiologico, costituiscono un fattore critico nella produzione farmaceutica; infatti, devono essere sottoposte a una qualifica iniziale. Tale processo deve definire chiaramente le metodologie di campionamento e di analisi, i punti di prelievo, la strumentazione impiegata, i criteri di accettazione e le azioni correttive. [5] [16] [17] Al fine di valutare l'efficacia di un programma di pulizia, è essenziale predisporre un piano di monitoraggio ambientale. [14] Il monitoraggio ambientale, di per sé, non garantisce la qualità finale di un prodotto, ma permette di verificare la validità del piano di controllo messo in atto

e di indentificare eventuali fonti di contaminazione, con il fine di eseguire azioni correttive idonee ed evitare la contaminazione del prodotto, incluse le cross-contaminazioni tra diversi prodotti. [5] [16] [17]

Il controllo delle contaminazioni ambientali si articola in due tipologie di verifica:

- Contaminazione particellare (non vitale): consente di quantificare il numero totale di particelle attraverso l'uso di uno strumento di conta.
- Contaminazione microbica (vitale): consente di quantificare e identificare il numero di microrganismi presenti nell'aria, sulle superfici dell'ambiente e delle macchine e, ove possibile, sul personale.

Il monitoraggio ambientale che coinvolge farmaci sterili segue le Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*). Secondo le GMP, i limiti di accettabilità riguardanti le contaminazioni particellari (**tabella 2**) e i limiti di accettabilità riguardanti la contaminazione microbica (**tabella 3**) si possono distinguere in base alla classe di contenimento (classe di grado A, B, C e D): la produzione di ATMP è, di solito, condotta in un ambiente di classe A che a sua volta è contenuto in un ambiente di classe B. Inoltre, i limiti si differenziano sulla base dello stato degli ambienti, sono più restrittivi quando tutti gli apparati sono in funzione ma non è presente del personale, e in questo caso sono definiti *at rest* (a riposo), rispetto allo stato *in operation* (in funzione), dove la produzione è in corso ed il personale è presente. [5] [17]

Grado	Limiti massimi consigliati per particelle $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$		Limiti massimi consigliati per particelle $\geq 5 \mu\text{m}/\text{m}^3$	
	in operation	at rest	in operation	at rest
A	3.520	3.520	20	20
B	352.000	3.520	2.900	29
C	3.520.000	352.000	29.000	2.900
D	Limite basato sul risk assessment	3.520.000	Limite basato sul risk assessment	29.000

Tabella 2: limiti particellari consentiti secondo Eudralex vol.4, Parte IV
(EU GMP per ATMP, ediz. 2018).

Grado	Air sample cfu/m ³	Settle plates (diameter 90mm) cfu/4 hours*	Contact plates (diameter 55 mm) cfu/plate
A**	<1	<1	<1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Tabella 3: limiti di contaminazione microbica consentiti secondo Eudralex vol.4, Parte IV
(EU GMP per ATMP, ediz. 2018).

*I limiti si riferiscono a piastre esposte per 4 h; in caso di esposizione per un tempo inferiore, i limiti indicati sono comunque da considerare.

**I limiti per la classe A sono di 0 CFU.

È importante specificare che il monitoraggio ambientale deve essere eseguito in tutti gli ambienti classificati (classe A, B, C, e D) e avviene attraverso il campionamento dell'aria per la valutazione delle particelle vitali e non vitali e per quanto riguarda la valutazione microbica avviene attraverso il campionamento delle superfici, dell'operatore e dell'acqua degli incubatori utilizzati per la produzione.

I campionamenti ambientali all'interno dei locali classificati possono essere condotti secondo due differenti modalità operative, in base alla finalità del controllo:

- Campionamenti di routine (*in operation* e *at rest*): il loro scopo è quello di monitorare, in modo continuativo, il livello di contaminazione microbiologica e particellare negli ambienti, l'efficacia delle operazioni di pulizia e igienizzazione, il livello di contaminazione derivante dagli operatori e le condizioni ambientali durante lo svolgimento dei processi produttivi.
- Campionamenti intensivi: vengono svolti durante le attività di convalida e riconvalida e il loro scopo è quello di qualificare o riqualificare le aree classificate e il personale coinvolto, convalidare o riconvalidare le procedure di *cleaning*, i processi produttivi e le operazioni di imbustamento dei materiali.

In definitiva, il monitoraggio microbiologico ambientale si conferma uno strumento fondamentale per la valutazione globale dei processi produttivi. Inoltre, risulta cruciale non limitarsi alla sola quantificazione assoluta della carica particellare e microbica, ma bensì, interpretare i dati in chiave critica, con il fine di rilevare tempestivamente condizioni di allerta,

mettendo in atto azioni preventive in modo da evitare situazioni di allarme (fuori controllo), così da poter garantire la qualità, la sicurezza e la conformità del prodotto farmaceutico destinato al paziente. [17] I livelli di allarme sono quelli definiti nell'ambito delle GMP per ATMP, e riportati nelle *tabelle 2 e 3*. Ogni officina di produzione deve, però, identificare i livelli di allerta per la carica particellare e microbica, e stabilire, in base ai diversi livelli di allerta, eventuali azioni preventive/correttive da mettere in atto sulla base della gravità dello scostamento rilevato.

Il monitoraggio del campionamento ambientale produce una grossa mole di dati, che devono essere raccolti, revisionati ed analizzati per cogliere variazioni nell'andamento temporale (*trend*). La valutazione periodica (semestrale o annuale) delle variazioni riscontrate nel monitoraggio ambientale sono utilizzate per effettuare una *trend analysis*. Quest'ultima è alla base della revisione dell'analisi del rischio per la sicurezza di impianti e processi.

1.3. Convalida delle procedure di Cleaning

Uno tra gli obiettivi delle Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*GMP*) è quello di garantire che la produzione di medicinali avvenga nel rispetto dei più elevati standard di sicurezza, minimizzando ogni potenziale rischio di salute per il paziente. A tal proposito, la convalida dei processi rappresenta un requisito essenziale.

Nell'ambito delle attività di convalida, la convalida delle procedure di pulizia riveste un ruolo di primaria importanza. Tale processo ha lo scopo di fornire prove documentate sulla capacità delle procedure adottate di rimuovere, in modo costante e riproducibile, i contaminanti chimici e particellari presenti sulle superfici. Nello specifico, deve garantire che la possibilità di contaminazioni crociate (*cross contamination*) dovute al fenomeno del *carryover* (residui di sostanze precedentemente lavorate), i prodotti di degradazione e gli agenti detergenti vengano ridotti al di sotto dei limiti di tolleranza definiti in modo analitico e scientifico. [18]

Le cause di contaminazioni crociate (*cross contamination*) sono molteplici, tra i meccanismi principali che stanno alla base si possono evidenziare quattro categorie principali:

- *Mix-up*: scambio o mescolamento accidentale di prodotti o materiali.
- *Retention*: trattenimento o adesione di residui sulle superfici di contatto.
- *Mechanical transfer*: trasferimento meccanico di contaminanti
- *Airborne transfer*: veicolazione per via aerea di particelle o vapori. [19]

L'introduzione della linea guida ICH Q9 ha reso obbligatorio l'impiego del *Quality Risk Management* (QRM) in tutte le aree GMP, incluso la *cleaning validation*. In quest'ottica, le

procedure di pulizia vengono gestite analogamente al processo produttivo. L'iter di analisi dei rischi si articola in diverse fasi:

- *Risk identification*: in questa fase iniziale vengono individuati i *critical quality attributes* (CQA), ovvero i limiti di contaminazione ammissibili e i potenziali rischi legati alle procedure operative e alle rispettive apparecchiature.
- *Risk analysis* e *Risk evaluation*: la fase di analisi prende in esame tutti gli elementi operativi al fine di definire ed eseguire i cicli di qualifica necessari alla verifica dell'efficacia delle procedure di pulizia.
- Analisi sistematica: costituisce la base per definire le misure tecniche e organizzative indispensabili per prevenire ed evitare i fenomeni di *cross-contamination*.

Seguendo questo percorso, il processo di *cleaning validation* può essere sviluppato nelle seguenti fasi:

- Fase 1: consiste nella progettazione e nello sviluppo del progetto di pulizia con il fine di garantire una pulizia efficace, controllata e documentata, prima dell'attuazione del piano. Il risultato finale di questa fase sarà la definizione di un *Cleaning Validation Master Plan* (o analogo documento programmatico) in cui vengono stabilite le *policy* e i criteri generali della *cleaning validation* e da cui verranno, in seguito, prodotti i protocolli di qualifica delle procedure di pulizia specifici per ambienti e apparecchiature. Per questo motivo, al fine di eseguire una successiva analisi del rischio idonea, è necessario raccogliere un set informativo che includa il layout dell'area di produzione, l'elenco completo delle apparecchiature e delle relative caratteristiche tecniche, la lista di tutti i prodotti lavorati con i relativi dati farmacologici e tossicologici essenziali per la determinazione dei limiti di accessibilità, i flussi di processo di produzione, SOP di pulizia e dati storici sulle attività svolte.
- Fase 2: consiste nella qualifica del processo di pulizia così da poter valutare le capacità delle procedure di assicurare risultati efficaci e riproducibili nel tempo. In termini pratici, corrisponde alla convalida vera e propria, condotta attraverso la ripetizione e la verifica del processo di pulizia per un numero predefinito di volte e l'attuazione di un piano di campionamento ed analisi approfondito per ogni apparecchiatura con lo scopo di dimostrare l'efficacia della procedura stessa.
- Fase 3: consiste nel monitoraggio continuo finalizzato a garantire che le procedure di pulizia rimangano efficaci e sotto controllo attraverso un programma di monitoraggio continuo.

I metodi di campionamenti accettati nell'industria farmaceutica per le analisi di pulizia possono essere di due tipi: diretti e indiretti. Il primo consiste nello *swab method*, ed è il metodo preferenzialmente usato, avviene tramite lo strofinamento di un tampone, imbevuto con un solvente adatto, su una porzione di superficie definita durante lo sviluppo e la convalida del metodo analitico. Le zone da sottoporre al campionamento sono definite mediante un'analisi dei rischi basata sui concetti di accessibilità e facilità di pulizia, e devono comprendere le aree maggiormente critiche delle apparecchiature, come, ad esempio, angoli e spigoli. Il metodo indiretto, invece, consiste nello *rinse method*, dove o il prelievo del campione viene effettuato durante l'ultima operazione di risciacquo dell'apparecchiatura oppure durante uno step aggiuntivo dedicato al risciacquo.

La combinazione di questi metodi garantisce un'ottima rappresentazione del grado di contaminazione delle superfici. [18] Tuttavia, il *rinse method* è principalmente utilizzato in impianti industriali, mentre nel caso di officine di produzione di ATMP, soprattutto se accademiche, le apparecchiature sono estremamente delicate e non si prestano a questa tipologia di *cleaning*. Nella *tabella 4* è possibile osservare i vantaggi e gli svantaggi di entrambi i metodi.

Un aspetto fondamentale per la *cleaning validation* è la definizione dei limiti massimi di contaminazione, i quali si basano su un solido razionale scientifico. L'introduzione delle linee guida europee sui limiti di esposizione basati sulla salute (*Health-Based Exposure Limits*, HBEL) ha formalizzato l'impiego del *Permitted Daily Exposure* (PDE) come parametro di riferimento per la sicurezza tossicologica [20]. Tale valore stabilisce la soglia massima di sicurezza che deve essere garantita; per definire i limiti della *cleaning*, il PDE deve essere associato ad altri criteri, storicamente utilizzati per il calcolo del limite massimo di contaminazione (*Maximum Allowable Carryover*, MACO) che corrisponde al livello, in milligrammi, di contaminante residuo ammesso all'interno del lotto di dimensioni minime (*batch size*) del prodotto lavorato successivamente.[21]

In alternativa al PDE, qualora non siano disponibili dati farmacologici e di tossicità, ad esempio, per gli impianti di produzione di principi attivi, è consentito ricorrere a criteri alternativi come la *Threshold of Toxicological Concern* (TTC) [22] [23].

	Vantaggi	Svantaggi
Metodo diretto: <i>swab method</i>	– Rappresenta l'esatto grado di contaminazione della superficie – Consente di focalizzarsi sulle zone maggiormente critiche e difficili da pulire – Consente una rimozione sia chimica che fisica del residuo – Permette flessibilità nell'uso dei solventi	– Limitata rappresentatività del campione, poiché il prelievo viene effettuato su un'area circoscritta – Accessibilità limitata – Variabilità operatore-dipendente
Metodo indiretto: <i>rinse method</i>	– Copertura globale delle superfici poiché fornisce una valutazione del grado di contaminazione sull'intera superficie dell'apparecchiatura bagnata dal solvente. – Efficacia su componenti smontabili	– Dipendenza dalla solubilità del contaminante – Criticità legata all'effetto diluizione che rischia di abbassare la concentrazione del residuo rendendolo non quantificabile

Tabella 4: Vantaggi e svantaggi metodo diretto (*swab method*) e metodo indiretto (*rinse method*).

Nel caso di officine che producono farmaci cellulari, sono utilizzati i limiti di contaminazione definiti dall'*Annex 1* dell'*EudraLex* vol.4, e riportati nelle GMP per ATMP, descritti nelle *tabelle 2 e 3* del capitolo precedente.

La robustezza del sistema di sanitizzazione si fonda anche su elementi organizzativi:

- Procedure Operative Standard (SOP) dettagliate per ciascuna area e superficie, che specifichino agente, concentrazione, tempo di contatto, frequenza e responsabilità;
- Registrazioni delle attività di *cleaning* eseguite (*log* cartacei o elettronici), a supporto della tracciabilità richiesta in ambito GMP;

- Formazione e qualifica del personale, con verifica periodica delle competenze pratiche (non solo teoriche) nell'esecuzione delle procedure di sanitizzazione, incluse le tecniche di vestizione per l'accesso alle aree classificate;
- Gestione del cambiamento (*Change Control*) per qualsiasi modifica ai sanitizzanti impiegati, alle concentrazioni o alle procedure, con relativa valutazione dell'impatto sulla qualità del prodotto.

Nelle strutture di produzione di ATMP, la sanitizzazione non può essere considerata un'attività meramente accessoria, ma costituisce un pilastro della strategia di contaminazione *control*, spesso l'unica barriera efficace in assenza di sterilizzazione terminale del prodotto finito. Una gestione efficace richiede la selezione di agenti con spettro d'azione adeguato (inclusa l'attività sporicida), l'adozione di piani di rotazione motivati, procedure applicative rigorosamente definite e convalidate, un programma di monitoraggio ambientale integrato e un solido impianto documentale e formativo. Solo l'integrazione coerente di questi elementi, nell'ambito di una *Contamination Control Strategy* complessiva, consente di garantire la sicurezza microbiologica dei prodotti di terapia avanzata e, in ultima analisi, la sicurezza del paziente.

1.3.1 Microrganismi resistenti

All'interno degli ambienti di produzione farmaceutica, la presenza di contaminanti microbiologici è strettamente correlata alle specifiche sorgenti di provenienza dei diversi ceppi organici.

I principali microrganismi riscontrabili sono:

- Bacilli gram-negativi: si possono riscontrare principalmente nell'acqua o nelle matrici liquide presenti all'interno dello stabilimento, rappresentando un classico indicatore di contaminazioni da fluidi di processo o di lavaggio.
- Bacilli gram-positivi e funghi: sono riconducibili all'ambiente esterno e vengono veicolati all'interno delle aree produttive prevalentemente attraverso il suolo e le correnti d'aria.
- Cocchi gram-positivi e cocchi gram-negativi: trovano la loro fonte primaria nel personale operativo, costituendo la componente tipica della flora microbica cutanea e respiratoria degli operatori.

Qualora negli ambienti di produzione o sulle apparecchiature vengano rilevati microrganismi caratterizzati da una resistenza significativa è necessario adottare un'opportuna strategia operativa. [14]

Il primo approccio sostitutivo prevede l'impiego di un disinfettante alternativo inserito nel programma di rotazione aziendale e/o l'adozione di un agente sporicida specifico, nel caso in cui la contaminazione sia riconducibile a microrganismi sporigeni. Nel caso in cui i trattamenti di routine non dovessero garantire un'adequata decontaminazione, è necessario ricorrere a trattamenti di decontaminazione ambientale avanzata attraverso nebulizzazione o trattamento con gas dei locali e dei macchinari. [24]

A tal fine, l'agente maggiormente impiegato è il perossido di idrogeno, il quale, sebbene, possa mostrare un'efficacia parzialmente limitata nei confronti di alcune spore batteriche e alcune specie di *Mycobatteri*, risulta meno aggressivo e deleterio sui materiali e sulle superfici rispetto ad altri agenti chimici, come la formaldeide.

In alternativa, è possibile impiegare il vapore di formaldeide, il quale, però, presenta criticità rilevanti legate alla tossicità, all'azione irritante del gas e al rischio di esplosività per concentrazioni superiori al 7.7%. Infatti, può essere utilizzato per la decontaminazione delle attrezzature, ma è indispensabile predisporre di un sistema di estrazione dei vapori efficiente e sicuro, soprattutto nel caso in cui il suo utilizzo è esteso all'intero locale.

Data la complessità e i rischi associati all'impiego di gas e vapori decontaminanti, è altamente raccomandato che tali operazioni vengano affidate a personale specializzato o a ditte esterne qualificate. [14]

1.3.2 Convalida disinfettante

Per prevenire la selezione e lo sviluppo di ceppi microbici resistenti, è fondamentale adottare un programma di rotazione tra differenti classi di disinfettanti, ad esempio, agenti fenolici e non fenolici.

Quando si stabilisce un programma di rotazione, risulta essenziale monitorare l'andamento del numero di unità formanti colonie recuperate, specialmente in seguito al cambio del disinfettante, così da dimostrare che il secondo disinfettante garantisca un'efficacia almeno equivalente a quella del primo. In tale contesto, è fondamentale l'impiego dei disinfettanti alle concentrazioni raccomandate o validate, infatti, una concentrazione troppo bassa ne compromette la validità rendendo il trattamento inefficace, mentre, dosaggi di concentrazioni

troppo elevate potrebbero danneggiare le superfici trattate.

Per garantire la sicurezza e l'efficacia di tali procedure, sia l'Unione Europea che la FDA (*Food and Drug Administration*) hanno elaborato linee guida di convalida basate sui criteri di convalida e sulle aspettative relative alle procedure di pulizia. Ad oggi, vengono sottolineati i seguenti aspetti:

- L'adozione di un piano dettagliato che illustri le modalità di valutazione dei processi di pulizia, le pratiche operative, e i risultati degli studi di convalida per ogni singola apparecchiatura o superficie.
- La definizione di una solida motivazione scientifica a supporto della strategia scelta, in grado di dimostrare l'efficacia delle procedure di pulizia
- L'aggiornamento costante dei protocolli di convalida, includendo l'analisi delle situazioni più critiche. [25] [26]

Nello specifico, per quanto riguarda la convalida dei disinfettanti, i requisiti chiave stabili dall'Unione Europea sono contenuti all'interno dell'allegato 15 del volume 4 delle linee guida dell'UE sulle GMP per uso umano e veterinario.

Prima dell'introduzione in uso di routine, ogni sanitizzante deve essere sottoposto a un programma di convalida che dimostri:

- l'efficacia del prodotto contro un pannello di microrganismi rappresentativi (batteri Gram positivi e Gram negativi, lieviti, muffe e, per gli agenti sporicidi, spore di *Bacillus subtilis* o *Geobacillus stearothermophilus*);
- l'efficacia nelle condizioni reali d'uso, inclusi i materiali delle superfici della struttura (studi di superficie);
- l'assenza di interferenze significative con i microrganismi isolati durante il monitoraggio ambientale di routine (*challenge test* con isolati ambientali, se rilevanti);
- la neutralizzazione adeguata del disinfettante nei metodi di campionamento microbiologico, per evitare falsi negativi nel monitoraggio ambientale.

La convalida deve essere periodicamente rivista, in particolare in caso di modifica della formulazione del prodotto, di cambio fornitore o di introduzione di nuove aree/materiali nella struttura.

La normativa richiede che la procedura di disinfezione convalidata sia in grado di garantire una riduzione della carica microbica compresa tra i 4-5 logaritmi (4-5 log) [27].

Inoltre, la Commissione Europea ha affermato che il mondo accademico deve essere riconosciuto come uno dei principali partner e contributore fondamentale nello sviluppo dei medicinali per terapie avanzate. Di conseguenza, le strutture di dimensioni minori devono essere supportate dall'adozione di un approccio basato sulla valutazione del rischio, in linea con le indicazioni della FDA (*Food and Drug Administration*) e con quanto previsto dalle normative Europee sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*). [14]

2. SCOPO DEL LAVORO

La produzione di Medicinali per Terapie Avanzate (ATMP), comprendenti terapie geniche, cellulari e i prodotti di ingegneria tissutale, rappresenta uno degli ambiti più innovativi e in rapida crescita della medicina moderna. Questi prodotti, spesso destinati al trattamento di patologie gravi, rare o prive di alternative terapeutiche efficaci, sono caratterizzati da processi produttivi complessi, da una elevata variabilità biologica della materia prima (cellule e tessuti di origine umana) e, in molti casi, da tempistiche di produzione e rilascio estremamente ridotte rispetto ai farmaci convenzionali. Tali peculiarità rendono la produzione di ATMP particolarmente sensibile al rischio di contaminazione microbiologica, che può compromettere non solo la qualità e l'efficacia del prodotto finale, ma soprattutto la sicurezza del paziente, considerando che molti ATMP vengono somministrati direttamente per via sistemica o impiantati, spesso in soggetti immunocompromessi.

Il controllo della contaminazione microbiologica rappresenta pertanto un requisito imprescindibile lungo tutto il processo produttivo, dalla ricezione della materia prima fino al rilascio del prodotto finito, e deve essere garantito attraverso un approccio integrato basato sull'analisi del rischio microbiologico, la quale è condotta tenendo in considerazione molteplici fattori, tra cui: le caratteristiche della struttura e delle aree di produzione, le fasi del processo di produzione, i flussi del personale e dei materiali, le probabilità di contaminazione, l'identificazione dei punti di campionamento, le procedure di pulizia e sanificazione e, in particolare, l'efficacia delle procedure di pulizia e disinfezione delle aree di produzione e delle attrezzature. Le procedure di *cleaning* costituiscono infatti uno degli elementi cardine del sistema di controllo della contaminazione, in quanto finalizzate alla rimozione di residui di processo, particolato e carica microbica dalle superfici delle aree classificate e delle apparecchiature critiche. L'efficacia di tali procedure dipende in maniera determinante dalla corretta selezione, qualificazione e convalida dei disinfettanti impiegati, che devono essere in grado di garantire un adeguato spettro di attività antimicrobica nelle reali condizioni di utilizzo previste dal laboratorio.

Sulla base di questo contesto, il presente lavoro di tesi si è concentrato sulla convalida di un agente disinfettante, nello specifico il disinfettante *Klercide Low Residue Quat*, da inserire, con altri disinfettanti, nel programma di sanificazione dell'officina farmaceutica *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo. La convalida si è resa necessaria a causa della sostituzione del biocida precedentemente in uso, *Klercide Quat/Biguanide*, non più disponibile in commercio, con il nuovo prodotto *Klercide Low Residue Quat*.

Lo studio si è focalizzato sulla validazione dell'agente disinfettante, in modo tale da misurarne l'efficacia microbiologica, dimostrarne l'idoneità operativa e garantirne il rispetto dei requisiti normativi previsti dalle Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*). La convalida ha previsto la determinazione dell'attività antimicrobica del nuovo disinfettante nei confronti di un pannello di microrganismi selezionati, in particolare quattro ceppi standardizzati o endogeni batterici (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevibacterium casei*) e fungini (*Candida parapsilosis*), applicato su cinque tipologie di superfici rappresentative dell'ambiente di produzione, in presenza sia di un agente neutralizzante sia di una sostanza interferente, a simulare condizioni di sporco organico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Monitoraggio della contaminazione ambientale

Il monitoraggio della contaminazione ambientale all'interno della struttura farmaceutica denominata *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, avviene attraverso un procedimento di campionamento che è stato progettato prendendo in considerazione i layout dei locali, i flussi del personale, i flussi dei materiali, le attività che vengono eseguite, le probabilità di contaminazione e le contaminazioni crociate.

I campionamenti ambientali sono effettuati attraverso l'utilizzo di terreni di coltura solidi (o semi-solidi), i quali sono contenuti all'interno di piastre di polistirene con un diametro che varia dai 55 ai 90 mm e consentono la determinazione del valore indice di contaminazione microbica *Colony Forming Units* per m³ (CFU/m³). Nello specifico, il monitoraggio della contaminazione ambientale prevede l'utilizzo dei seguenti terreni:

- Piastre TSA90: hanno un diametro di 90 mm e contengono il terreno *Tryptic Soy Agar* (Agar Tripticasi Soia), il quale è idoneo alla crescita della maggior parte dei microrganismi, che non hanno particolari esigenze per la loro crescita, quali batteri mesofili, psicrofili e micromiceti. Sono utilizzate principalmente nei controlli per contatto sulle impronte dei guanti degli operatori e per il monitoraggio attivo dell'aria mediante l'utilizzo del SAS. (**Figura 2**)
- Piastre TSA55 Count-Tact®: hanno un diametro di 55 mm e contengono il terreno *Tryptic Soy Agar* (Agar Tripticasi Soia) integrato con un agente neutralizzante dei disinfettanti. Sono specificatamente progettate per il controllo e il monitoraggio delle superfici. (**Figura 3**)
- Piastre SDA55 Count-Tact®: hanno un diametro di 55 mm e contengono il terreno *Sabouraud Destrosio Agar* (Sabouraud Destrosio Agar) con l'aggiunta di Cloramfenicolo e neutralizzanti. Sono formulate per la rilevazione di lieviti e muffe sulle superfici e sono comunemente impiegate in combinazione con le piastre TSA55 per i campionamenti all'interno dei locali classificati C e D. (**Figura 4**)

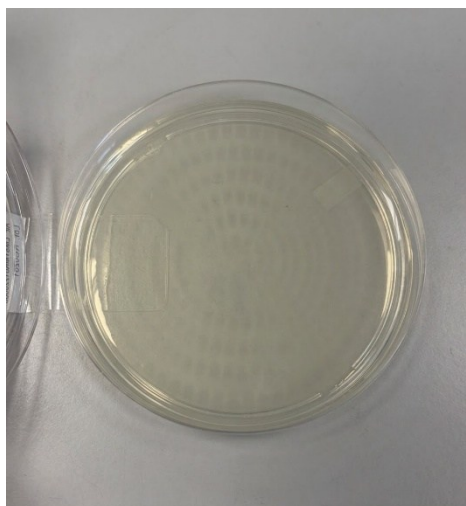


Figura 2: piastre TSA90.

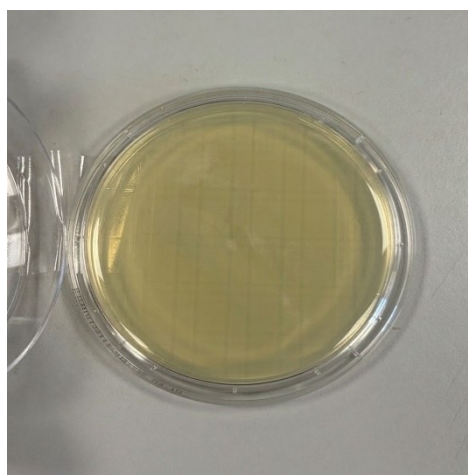


Figura 3: Piastre TSA55 Count-Tact®.

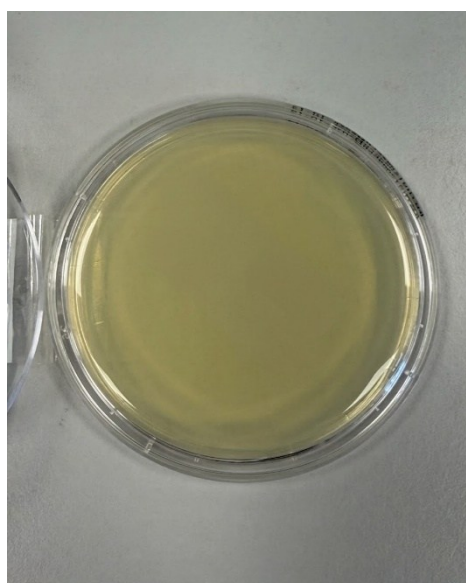


Figura 4: Piastre SDA55 Count-Tact®.

Il piano di monitoraggio dei livelli di contaminazione microbiologica negli ambienti di produzione può essere suddiviso in quattro categorie principali:

- Campionamento dell'aria: prevede il monitoraggio della contaminazione particellare totale e il monitoraggio della contaminazione microbiologica. Nello specifico, la prima è determinata attraverso l'uso di uno strumento conta-particelle, il quale rileva la concentrazione particellare per m³ d'aria analizzata. Negli ambienti di classe A dove sono svolte le attività di produzione e di classe B circostanti, il campionamento è eseguito mediante un sistema di monitoraggio continuo, mentre negli ambienti di classe B di transito e nei locali di classe C e D è eseguito con lo strumento conta-particelle portatile. Per quanto riguarda, invece, la contaminazione microbica dell'aria è eseguita mediante campionamento attivo che prevede l'utilizzo di un campionatore monostadio ad impatto ortogonale (*surface air system, SAS*) con piastre TSA90 e piastre SDA55, e campionamento passivo che è condotto esclusivamente nei locali di produzione mediante piastre a sedimentazione TSA90, le quali rimangono esposte per tutta la durata della sessione di lavoro, con un limite massimo di esposizione di 4 ore (**figura 5**).
- Campionamento delle superfici: sono utilizzate piastre TSA (con diametro da 55 mm o 90 mm), piastre SDA (con diametro da 55 mm) in parallelo alle TSA55 per le superfici in classe C e D, ed infine, tamponi floccati (*swab*) utilizzati per i punti critici e per la raccolta di campioni biologici, la cui aliquota, sarà, in seguito, inseminata su piastre TSA90. Negli ambienti di classe A e B il campionamento è eseguito con un'unica piastra TSA55 posta per 10 secondi sul punto identificato, mentre negli ambienti di classe C e D si esegue un primo campionamento con piastra TSA55 per 10 secondi e un secondo campionamento, nelle immediate vicinanze, con piastra SDA55 per 10 secondi. È fondamentale, dopo aver eseguito il campionamento, eliminare le tracce di terreno, attraverso l'uso di salviette imbevute di una soluzione di alcool isopropilico al 70% (*IPA 70/30*).
- Campionamento dell'operatore: è eseguito con lo scopo di valutare la contaminazione microbica dell'operatore e per convalidare la procedura, attraverso l'utilizzo di piastre TSA55 o TSA90 (**tabella 5**).

- Campionamento dell'acqua dell'incubatore: è eseguito mensilmente e prevede di prelevare l'acqua utilizzando una siringa da 50 ml sterile con forasacca sterile, trasferire l'acqua in provette sterili da 15 ml ed infine, trasferire l'acqua in flaconi *Bactec* per aerobi.

Classe A	Classe B
Avambraccio destro e sinistro, guanto destro e sinistro.	Fronte, mascherina, occhiali, torace, avambraccio destro e sinistro, gambale destro e sinistro, guanto destro e sinistro.

Tabella 5: punti di campionamento dell'operatore sulla base degli ambienti classificati.



Figura 5: campionatore monostadio ad impatto ortogonale (surface air system, SAS).

Infine, un ulteriore aspetto fondamentale è quello di definire i punti che devono essere campionati (*figura 6*) tale scelta si basa sulle attività di lavoro svolte durante la produzione e alla tipologia di lavorazione che viene eseguita.

classe B	Locale E	TSA 55 (25°) a contatto		TSA 55 (35°) a contatto		
MATERIALE introdotto dal Pass Box		psicrofili 72h	Rif. CFU plate: 5	mesofili 48h	Rif. CFU plate: 5	miceti
Involucro imbustamento		1AB		1AB		1AB
altro:		2AB		2AB		2AB

classe B				TSA 55 (25°) a contatto		TSA55 (35°) a contatto				TSA 90 (72h 25°+48h 35°) a caduta	
LOCALE	A	B	C	psicrofili 72h	Rif. CFU plate: 5	mesofili 48h	Rif. CFU plate: 5	miceti	Rif. CFU plate: 5	tutti 5gg	Rif. CFU plate (4h): 5
					CFU/m³ 10		CFU/m³ 10		CFU/m³ 10		
involucro imbustamento				3AB		3AB		3AB			
confezione di piastre x campionamento				4AB		4AB		4AB			
confezione di materiale plastico disponibile				5AB		5AB		5AB			
flacone				6AB		6AB		6AB			
maniglia porta interna				7AB		7AB		7AB			
centrifuga coperchio				8AB		8AB		8AB			
centrifuga interno				9AB		9AB		9AB			
bagnetto esterno				10AB		10AB		10AB			
bagnetto interno				11AB		11AB		11AB			
* microscopio manopola				12AB		12AB		12AB			

* microscopio oculari				13AB		13AB		13AB			
bancone (zona microscopio)				14AB		14AB		14AB			
esposizione a caduta: minuti										14D	
incubatore porta	1	3	5	15AB		15AB		15AB			
incubatore ripiano: alto medio basso	1	3	5	16AB		16AB		16AB			
incubatore porta	2	4	6	17AB		17AB		17AB			
incubatore ripiano: alto medio basso	2	4	6	18AB		18AB		18AB			
mascherina tasti cappa n.				19AB		19AB		19AB			
tastiera PC				20AB		20AB		20AB			

occhiali	xx48AB		48AB		48AB	
mascherina	xx49AB		49AB		49AB	
torace	xx50AB		50AB		50AB	
avambraccio dx	xx51AB		51AB		51AB	
avambraccio sx	xx52AB		52AB		52AB	
guanto dx	TSA90 xx53AB		53AB		53AB	
guanto sx	TSA90 xx54AB		54AB		54AB	
gambale dx	xx55AB		55AB		55AB	
gambale sx	xx56AB		56AB		56AB	

* swab + TSA90

** la piastra 29E è incubata solo a 25°C per 5gg

Piastre				
	Lotto	Scadenza	Lotto	Scadenza
TSA 55				
TSA 90				
Swab				

Campionamento eseguito da:	Note:

Figura 6: esempio schema con punti di campionamento microbiologico dei laboratori di produzione.

3.2 Gestione ceppi contaminati

La gestione dei ceppi contaminati, che derivano dal monitoraggio della contaminazione ambientale, comprende un insieme di procedure finalizzate a raccogliere, leggere, isolare, identificare, conservare e, eventualmente, utilizzare i microrganismi ricavati dai campionamenti ambientali.

A tal proposito, dopo aver eseguito i campionamenti, le piastre chiuse ed etichettate sono trasportate, mediante una scatola di trasporto dedicata e seguendo specifiche procedure, all'interno del laboratorio di Controllo e Qualità Microbiologico, così da poter procedere con la fase di incubazione in termostati a secco.

Presso il laboratorio, l'operatore è tenuto a compilare il registro di consegna e accettazione piastre controllo ambientale (**tabella 6**), così da poter essere prese in carico dall'operatore del laboratorio di Controllo e Qualità Microbiologico (OCQM).

Data di consegna	Ora di consegna	Cognome e firma dell'operatore	Numero delle piastre consegnate	Etichetta del campionamento	Data e firma di presa visione OCQM
------------------	-----------------	--------------------------------	---------------------------------	-----------------------------	------------------------------------

Tabella 6: registro di consegna e accettazione piastre controllo ambientale

In particolare, le piastre di campionamento sono incubate con tempi e temperature differenti, sulla base della tipologia di terreno e del target microbiologico:

- Piastre TSA90 e TSA55: prevedono un'incubazione sequenziale, in un primo momento sono incubate a 25°C per 72 ore così da poter favorire la crescita dei microrganismi psicrofili e i miceti. Trascorso questo tempo, sono trasferite in un incubatore a 35° per ulteriori 48 ore, in modo tale da raggiungere un totale di cinque giorni e ottimizzare il recupero dei miceti. Durante il trasferimento da un incubatore all'altro dovranno essere segnate le prime colonie comparse.
- Piastre TSA90 (campionamento passivo dell'aria in classe A): sono incubate a temperatura ambiente (25°C) per un totale di cinque giorni, condizione mirata alla crescita dei miceti.

- Piastre SDA: sono incubate a temperatura ambiente (25°C) per un totale di cinque giorni, condizione mirata alla crescita dei miceti.

Dopo il processo con i tempi specifici di incubazione, le piastre sono rimosse dai rispettivi incubatori, in modo tale da poter procedere con la lettura delle colonie, eseguita sulla base della classe nella quale sono state rilevate le colonie (*tabella 7*), il risultato è espresso in *colony forming unit* (CFU).

	Identificazione di genere	Identificazione di specie
Classe A	Tutte le colonie	Tutte le colonie
Classe B	Tutte le colonie	Tutte le colonie
Classe C e classe D	Tutte le colonie, se eventualmente possibile	Tutte le colonie, se eventualmente possibile

Tabella 7: *schema lettura colonie sulla base della classificazione degli ambienti.*

Inoltre, per il monitoraggio condotto nelle classi C e D, l'utilizzo di una piastra TSA55 affiancata ad una piastra SDA55 è valutato come un unico punto di campionamento, di conseguenza il valore complessivo della contaminazione è calcolato sommando le colonie rilevate dal singolo punto campionato (*tabella 8*).

Colonie rilevate dopo incubazione della piastra TSA a 25°C per 72 ore	x
Colonie rilevate dopo incubazione della stessa piastra TSA a 35°C per altre 48 ore	y
Colonie rilevate dopo incubazione della piastra SDA a 25°C per 5 giorni (ove eseguita)	z
Colonie totali	x+y(+z)

Tabella 8: *schema di calcolo del valore di contaminazione nel caso in cui siano utilizzate una piastra TSA55 e una piastra SDA55 per lo stesso punto di campionamento.*

In definitiva, la fase di lettura delle piastre assume un ruolo fondamentale nella gestione della contaminazione microbiologica. Infatti, un'accurata rilevazione della crescita delle colonie costituisce, il presupposto indispensabile per le fasi successive del processo.

3.2.1 Isolamento e identificazione dei ceppi

Dopo aver terminato la lettura e una prima valutazione morfologica delle colonie, è necessario eseguire l'isolamento delle colonie, con il fine di ottenere una coltura pura per procedere con l'identificazione. L'isolamento delle colonie prevede l'utilizzo di un'ansa sterile monouso, con la quale si preleva con delicatezza la porzione di colonia d'interesse direttamente dal terreno delle piastre, risultate positive (**figura 7**), dei campionamenti ambientali. Successivamente, il materiale appena prelevato sarà seminato su nuove piastre che contengono un terreno di coltura idoneo a favorire la crescita dei microrganismi (**figura 8**). Nello specifico, la semina delle colonie è eseguita su di piastre Agar Sangue, le quali favoriscono la crescita di microrganismi esigenti e non esigenti, consentendo, inoltre, di osservare le loro caratteristiche emolitiche (distruzione globuli rossi), Agar Cioccolato che favorisce la crescita di batteri esigenti e Agar Sabouraud che favorisce la crescita dei miceti. (**Figura 9**)



Figura 7: Piastra campionamento positiva.

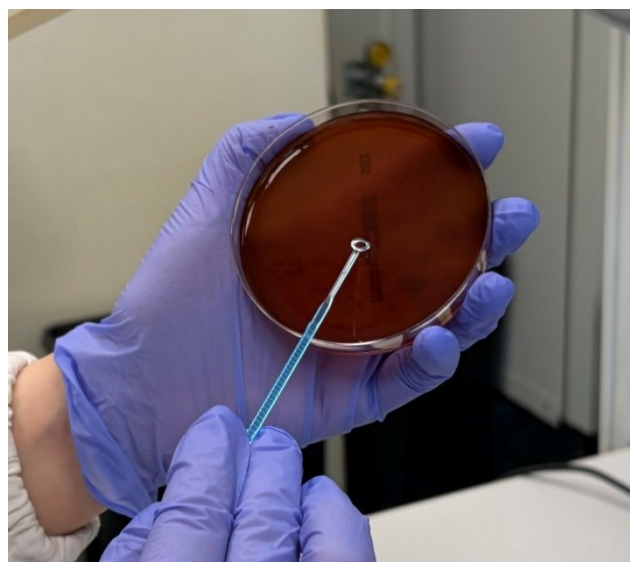


Figura 8: Isolamento delle colonie.

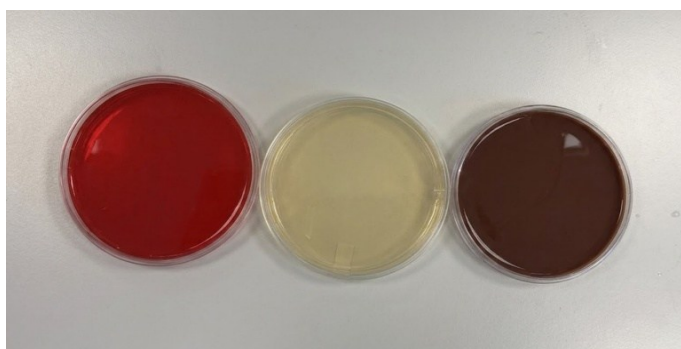


Figura 9: Agar Sangue, Agar Sabouraud e Agar Cioccolato.

Dopo aver completato la semina per gli isolamenti le piastre sono trasferite e posizionate all'interno degli incubatori, questa fase di incubazione è condotta tenendo in considerazioni, principalmente, due parametri, ovvero il tempo e la temperatura. Infatti, le piastre Agar Sangue e Agar Cioccolato sono poste in un incubatore a 35°C per un tempo che varia tra le 24 e le 48 ore, mentre, le piastre Agar Sabouraud in un incubatore a 25° per cinque giorni così da favorirne la crescita dei miceti.

A seguito dell'isolamento (*figura 10*) e dell'incubazione delle piastre, contenenti il terreno, per il tempo stabilito, il processo di gestione dei ceppi contaminati prevede la fase di identificazione.



***Figura 10:** crescita della colonia isolata.*

L'identificazione si distingue a seconda della natura del microrganismo e prevede l'esame diretto al microscopio, con il fine di individuare la forma dei microrganismi (cocchi, bacilli, spirilli, lieviti o miceti e la loro disposizione (catenelle, a grappolo o a coppie), valutare la colorazione distinguendo Gram-positivi e Gram-negativi e verificare la purezza e la qualità della colonia. La procedura consiste nel mettere una goccia di soluzione fisiologica al centro del vetrino, prelevare una colonia con un'ansa sterile monouso e stemperarla, lasciare asciugare, successivamente il vetrino deve essere posto nel colora vetrini con il materiale rivolto verso l'operatore. Una volta bilanciato, chiuso il rotore e verificata la presenza dei reagenti può essere

avviata la colorazione. Dopo aver terminato questi passaggi il vetrino è osservato ad ingrandimento 100x ad immersione.

Nello specifico, in base alla morfologia e alle caratteristiche emerse sono distinte due tipologie di identificazione:

- Identificazione di batteri: si utilizza un metodo automatizzato basato sulla spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*). Le colonie, precedentemente isolate, sono prelevate e stemperate in doppio nei pozzetti di una micropiastra specifica dello strumento (**figura 11**), successivamente in ciascun pozzetto è aggiunto 1 µl di acido formico che è lasciato asciugare a temperatura ambiente e 1 µl di matrice appositata che è, ugualmente, lasciata asciugare a temperatura ambiente prima dell'inserimento della micropiastra nello strumento. Dal campione analizzato si ottiene uno spettro di massa di ioni monocarica che è confrontato con gli spettri presenti nel database apposito dello strumento. Il programma calcola un punteggio identificativo arbitrario, chiamato “valore di confidenza” o “score” che riflette il grado di corrispondenza con lo spettro di riferimento. A seconda del punteggio ottenuto è possibile stabilire se l'identificazione ha avuto esito positivo o meno, un valore < di 1.7 non permette l'identificazione del microrganismo in esame, mentre, uno score > 1.7 consente l'identificazione del genere e della specie del microrganismo. Più il valore sarà elevato, maggiore risulterà l'attendibilità dell'identificazione.
- Miceti/lieviti: consiste nell'identificazione tramite microscopio, la procedura prevede l'allestimento di un vetrino porta oggetti, il quale è preparato con una goccia di lattofenolo cotton blue di Hamman al centro, la colonia deve essere prelevata dalla parte esterna, attraverso l'uso di scotch trasparente e posizionata sul colorante del vetrino. Il tutto è osservato ad ingrandimento 25x.

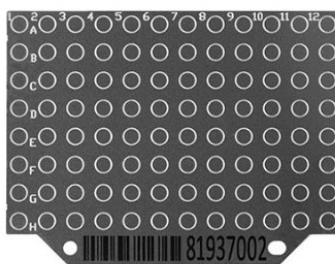


Figura 11: Micropiastra Maldi-TOF.

In sintesi, la fase d'identificazione viene condotta con lo scopo di caratterizzare la popolazione microbica presente all'interno dei locali classificati e di individuare le specie ricorrenti, così che possano essere attuate, ed eventualmente, ottimizzate le strategie di controllo ambientale.

3.2.2 Conservazione dei ceppi

A seguito del processo di identificazione, i ceppi batterici aerobi e anaerobi e quelli fungini isolati dalle piastre dei campionamenti ambientali e quindi derivanti dalle attività di monitoraggio della contaminazione ambientale possono essere conservati.

In particolare, le piastre, nelle quali sono stati isolati i microrganismi, devono essere conservate a 4°- 8°C per un massimo di 7 giorni e i ceppi possono essere sub coltivati per non più di quattro passaggi.

È fondamentale pianificare la conservazione dei ceppi (**figura 12**), prestando particolare attenzione a quelli rinvenuti nelle aree di classe B, al fine di costruire una “libreria” di microrganismi che è integrata con i ceppi ATCC (*American Type Culture Collection*) previsti dalla Farmacopea Europea [28], i quali comprendono batteri aerobi, batteri anaerobi, miceti e micoplasmi. Tale “libreria” sarà impiegata per l’allestimento dei controlli positivi e nelle convalide delle metodiche presso il laboratorio Controllo Qualità microbiologico della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo. Nello specifico, nell’ambito di questo progetto di tesi, per la procedura di convalida dei disinfettanti utilizzati nei protocolli di *cleaning* della *Cell Factory*.

[illegible]

Figura 12: modulo di tracciabilità dei microrganismi conservati che deve essere compilato al momento del ritiro dei ceppi.

Per la conservazione a lungo termine, i ceppi derivati dai campionamenti ambientali devono essere inoculati, dalle piastre degli isolamenti, all'interno delle *criovials* (*microbank*), le quali contengono delle perline e un terreno liquido di coltura, di fondamentale importanza per il mantenimento della vitalità dei ceppi di microrganismi (**figura 13**). Le colonie sono prelevate tramite un'ansia sterile monouso o un tampone sterile e risospese nel terreno liquido delle *criovials*; l'eccesso di terreno sarà poi rimosso mediante una pipetta *Pasteur* sterile e le provette contenenti i ceppi saranno stoccate ad una temperatura di -80°C.

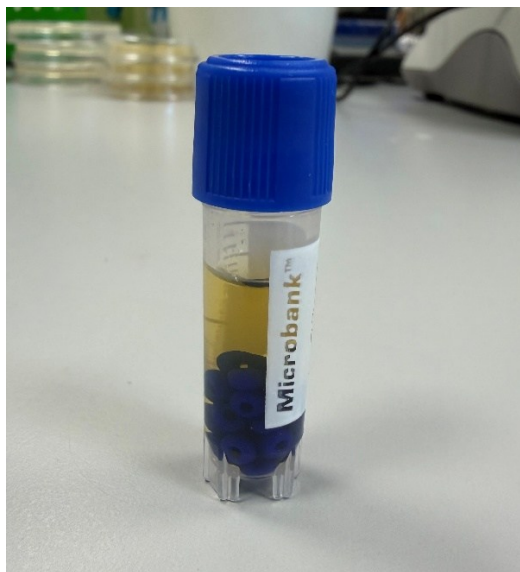


Figura 13: *criovials* (*microbank*).

La procedura che è adottata per la conservazione dei ceppi ATCC di riferimento forniti dalla Farmacopea Europea [28] segue le modalità che sono state descritte precedentemente per la conservazione dei ceppi endogeni derivati dai campionamenti ambientali, con l'eccezione rappresentata da una fase preliminare di ricostituzione. Infine, i ceppi ATCC appartenenti alle diverse specie del genere *Mycoplasma* (*Mycoplasma spp.*), dopo essere stati ricostituiti e cresciuti in terreno liquido *Hayflick* possono essere mantenuti in coltura effettuando fino ad un massimo di 15 nuove subcolture con frequenza settimanale. Questi ceppi, per la conservazione a lungo termine, devono essere stoccati in *criovials* (*microbank*), attraverso il prelievo di aliquote da 500 µl, ottenute da colture in fase di crescita esponenziale, e conservate a una temperatura di -80°C. Diversamente, per il DNA estratto dai ceppi ATCC di *Mycoplasma spp* e pronto all'uso, le condizioni di conservazione prevedono il mantenimento a -20°C.

3.2.3 Ricostituzione dei ceppi

Le analisi e i test che sono eseguiti nel laboratorio di Controllo Qualità microbiologico della *Cell Factory* prevedono l'impiego sia di ceppi di riferimento ATCC che di ceppi endogeni. I ceppi ATCC sono raccomandati dalla Farmacopea Europea [28] e sono suddivisi in batteri aerobi, batteri anaerobi, miceti e micoplasmi (*tabella 9*), mentre, i ceppi endogeni sono selezionati annualmente sulla base della *trend analysis*, focalizzandosi sui microrganismi maggiormente isolati all'interno degli ambienti classificati della *Cell Factory*.

Batteri Aerobi	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615
<i>Micrococcus species</i>	ATCC 700405
Batteri Anaerobi	
<i>Clostridium sporogenees</i>	ATCC 19404
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 11827
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285
Miceti	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
Micoplasmi	
<i>Mycoplasma hyorinis</i>	ATCC 17981
<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC 23714
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531
<i>Mycoplasma fermentans</i>	ATCC 19989
<i>Mycoplasma arginini</i>	DSM 19201
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ATCC 23206

Tabella 9: Ceppi ATCC forniti dalla Farmacopea Europea.

Al fine di poter procedere con le procedure analitiche di laboratorio, i ceppi ATCC, che si trovano in forma liofila, necessitano di un opportuno processo di ricostituzione, che deve essere eseguito secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice e dalle istruzioni operative di laboratorio.

In particolare, i ceppi di origine batterica (aerobi e anaerobi) e quelli fungini sono forniti sotto forma di pellet liofilizzato all'interno di un contenitore apposito (*kwik stik*), i quali sono costituiti da tre elementi principali: una parte superiore costituita da una fiala che contiene la soluzione idratante; una porzione centrale costituita da un tampone; ed infine, una parte inferiore contenente pellet.

La procedura di costituzione prevede diversi passaggi, tra i quali:

- rilascio della soluzione idratante: consiste nel premere la parte superiore costituita dalla fiala così da consentire la fuoriuscita della soluzione idratante;
- idratazione del pellet: è rappresentata dal mantenimento in posizione verticale del contenitore (*kwik stik*), che deve essere “picchiettato” delicatamente su una superficie solida, così da favorirne il flusso del liquido nella parte inferiore contenente il pellet.
- omogeneizzazione: deve essere esercitata una pressione sul fondo del contenitore con il fine di ottenere la completa dissoluzione e omogeneizzazione del pellet nella soluzione;
- inoculo: consiste nell'estrarre il tampone imbevuto di sospensione microbica e trasferirlo, attraverso un procedimento di inoculazione, nelle opportune piastre contenenti il terreno di coltura. A tal proposito, sono utilizzate le piastre Agar Sangue (*figura 9*) per i batteri aerobi e i miceti e le piastre Agar Schaedler per i batteri anaerobi;
- incubazione: le piastre devono essere incubate in termostato alla temperatura di 35°C per 72 ore, rispettando le condizioni gassose necessarie, condizioni di aerobiosi per le piastre Agar Sangue e anaerobiosi per le piastre Agar Schaedler.

Per quanto riguarda i ceppi di *Mycoplasma spp.*, anch'essi sono forniti in forma liofila, devono essere ricostituiti seguendo le specifiche istruzioni riportate dalla ditta *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DMSZ), presso la quale il ceppo è stato ordinato. [29]

La procedura si articola nelle seguenti fasi:

- apertura del contenitore: rappresentata dalla rottura dell'ampolla di vetro così da poter rimuovere il cotone protettivo e, successivamente, recuperare la *vial* interna contenente il ceppo liofilizzato;
- reidratazione: devono essere aggiunti 500 µl di terreno liquido di *Hayflick* all'interno della *vial*;
- dissoluzione: consiste nel sigillare la *vial* con un foglio di pellicola plastica (ad esempio il *parafilm*), la quale, successivamente, deve essere agitata delicatamente così da ottenere la completa dissoluzione del liofilizzato;
- sospensione e inoculo: dopo un'attesa di circa trenta minuti a temperatura ambiente, la soluzione deve essere risospesa e il pellet inoculato in una provetta contenente 4.5 ml di terreno liquido di *Hayflick*;
- incubazione: la coltura deve essere incubata a 35°C in atmosfera arricchita al 5% di CO₂ per un periodo che varia dai 3 ai 5 giorni, in base alle specifiche caratteristiche di crescita del ceppo specifico.

I ceppi ATCC devono essere scongelati annualmente con il fine di verificarne sia la vitalità che l'accurata conservazione nel tempo. A tal proposito, i ceppi ATCC, che sono stati conservati nelle *criovials* (*microbank*) contenenti le perline, sono seminati su terreni di coltura idonei e successivamente, incubati rispettando le condizioni di crescita ottimali definite dalla ditta fornitrice. Al termine del periodo di incubazione, si può procedere con l'identificazione di genere e specie, attraverso la preparazione della micropiastre (**figura 11**) per la spettrometria di massa MALDI-TOF.

3.3 Operazioni di pulizia all'interno della Cell Factory

Le operazioni di pulizia e disinfezione all'interno della *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo rappresentano un elemento chiave per la prevenzione delle contaminazioni particellari e microbiologiche, garantendo il rispetto dei requisiti di qualità e sicurezza previsti dalle Linee Guida sulle Buone Pratiche di Fabbricazione (*Good Manufacturing Practices, GMP*). Per comprendere appieno le procedure di pulizia nella *Cell Factory* e la loro frequenza, è fondamentale analizzarne la struttura e in particolare, gli ambienti classificati. L'officina farmaceutica (**figura 14**) è situata al terzo piano del Padiglione "Forlanini" della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo e, nel complesso, è dedicata alla preparazione di colture cellulari per la produzione di PMTC. Tale officina è costituita da:

- Tre laboratori di produzione (A-B-C) mantenuti a pressione positiva e classificati in classe ambientale B. Ogni laboratorio è dotato di cappe *biohazard* Classe II a flusso laminare verticale, le quali sono classificate in classe ambientale A e possiedono un impianto per conta particellare continua.
- Un locale I, in classe ambientale B, che garantisce il collegamento tra i laboratori di produzione, il locale frigoriferi, il locale *airlock/pass-box* e l'uscita di sicurezza.
- Un locale D, in classe ambientale B che rappresenta il locale frigoriferi.
- Un locale *airlock* denominato locale E, in classe ambientale B, provvisto di *pass-box* (classe ambientale B), a doppia entrata e uscita, di collegamento con il locale M (classe ambientale D) e dedicato al passaggio in sicurezza dei materiali e prodotti biologici in ingresso e uscita dall'officina stessa.
- Tre locali in sequenza adibiti alla vestizione e al transito del personale in ingresso e uscita, suddivisi in spogliatoio di primo livello (locale H, in classe D), spogliatoio di secondo livello (locale G, in classe C) e spogliatoio di terzo livello (locale F in classe B).
- Un locale L, in classe ambientale D, nel quale sono collocati il quadro elettrico e la visiva dei manometri analogici delle pressioni ambientali dei locali A-I, il gruppo statico di continuità (UPS), il registratore digitale delle pressioni ambientali dei locali A-B-C-E-I, della temperatura dei locali A-B-C-D e l'umidità dei locali A-B-C.
- Un locale M, in classe ambientale D, utilizzato come magazzino pulito e destinato al transito di materiali mediante *pass-box* e postazione PC di monitoraggio delle conte particellari e dei parametri critici delle apparecchiature.

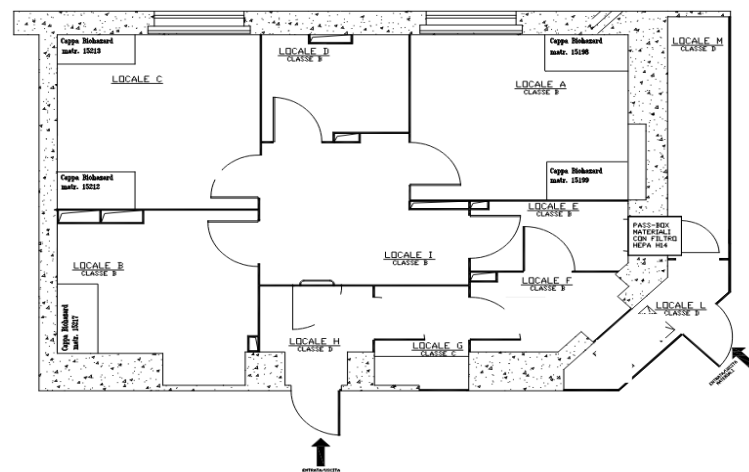
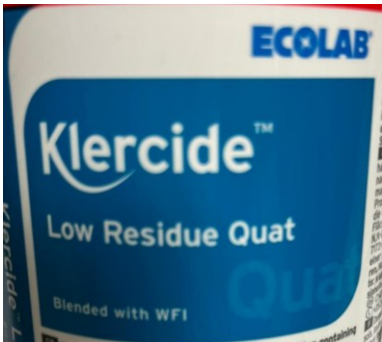


Figura 14: struttura della Cell Factory.

3.3.1 Sanitizzanti impiegati presso la Cell Factory

Gli agenti disinfettanti utilizzati per le procedure di *cleaning* sono scelti sulla base del loro spettro d'azione, sulla compatibilità con i materiali e sulla necessità di rotazione degli agenti stessi così da prevenire l'insorgenza di ceppi resistenti. Nello specifico, i sanitizzanti in uso presso la *Cell Factory* comprendono un Biocida A, un Biocida E, Alcool IPA e un detergente neutro (*tabella 10*).

Codifica Cell Factory	Nome commerciale e caratteristiche	Foto etichetta
Biocida A	<i>Klercide Quat/Biguanide</i> sostituito da <i>Klercide Low Residue Quat Sterile Spray</i> Attività: biocida Tempo di contatto: 5 minuti Data scadenza dall'apertura: 3 mesi	
Biocida E	<i>Klercide Sporicidal Active Chlorine Sterile Spray</i> Attività: sporicida Tempo di contatto: 10 minuti Data scadenza dall'apertura: 3 mesi	
Alcool IPA	<i>70% WFI Sterile IPA Spray</i> Data scadenza dall'apertura: 3 mesi	

Detergente neutro	<i>Klercide Neutral Detergent</i> Data scadenza dall'apertura: 3 mesi	
-------------------	---	---

Tabella 10: *sanitizzanti in uso presso la Cell Factory.*

3.3.2 *Cleaning dei locali*

Le procedure di pulizia all'interno dei locali sono correlate alla classificazione ambientale dei locali stessi e alla loro specifica destinazione d'uso. Nello specifico, in base alle procedure operative aziendali (SOP) le modalità e le frequenze del *cleaning* sono articolate come segue:

- Locali A, B, C, D e locale I: il materiale di pulizia deve essere depositato sul carrello nel locale I e le operazioni di pulizia devono iniziare da uno dei laboratori (A, B, C) e proseguire con gli altri due, iniziando dai soffitti e proseguendo con le griglie di ripresa, le pareti, l'esterno degli apparecchi, le porte, le maniglie e i pavimenti. Tali operazioni consistono nello spruzzare il sanitizzante su panni asciutti, con una quantità tale da lasciare uno strato omogeneo sulla superficie da pulire e passarlo sulla superficie eseguendo dei movimenti paralleli in un'unica direzione e sovrapposti di almeno 2-3 cm.

Il panno è sostituito nel momento in cui non lascia più un film omogeneo o quando appare sporco.

Per i soffitti deve essere utilizzato uno spazzolone apposito per la sanitizzazione con movimenti dall'alto verso il basso, mentre per i pavimenti, lo spazzolone deve essere utilizzato partendo dal fondo della stanza e proseguendo verso l'uscita con movimenti paralleli continui da sinistra verso destra, sovrapponendo le passate di 1-2 cm (*figura 15*).

Al termine delle operazioni nei tre laboratori si deve procedere con la pulizia del locale D, poi del locale I ed infine, si deve accedere al locale E portando con sé i sanitizzanti, lo spazzolone e i panni.

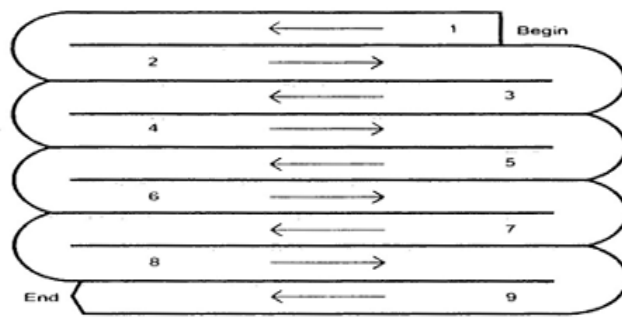


Figura 15: schema pulizia pavimenti.

- Locale E: in ingresso si devono recuperare i sanitizzanti indicati (posizionati sopra l'armadio), i sacchetti sterili e i panni per la pulizia, situati nell'armadio, così da accedere al locale I, mentre, in uscita si deve procedere con le operazioni di pulizia, lasciare sull'armadio i sanitizzanti in uso ed accedere al locale F, portando con sé i panni sterili in numero sufficiente per le operazioni nei locali F, G, H, un sacco contenente i panni sporchi precedentemente utilizzati e uno spazzolone per classe B.
- Locale F: in ingresso occorre indossare la tuta e successivamente prendere lo spazzolone dedicato agli ambienti classificati in classe B ed accedere al locale E, mentre in uscita si deve procedere alla pulizia utilizzando i prodotti sanitizzanti depositati e lasciare nel locale lo spazzolone dedicato alla classe B.
- Locale G: in ingresso lo spazzolone deve essere depositato e si deve indossare la mascherina e il secondo copricapo così da poter accedere al locale F, mentre, in uscita si deve procedere con la pulizia utilizzando i prodotti sanitizzanti depositati e accedere al locale H portando con sé lo spazzolone.
- Locale H: in ingresso si deve fermarsi sul tappeto adesivo, accendere le luci, indossare in successione cuffia, calzari e guanti e consultare il calendario delle sanitizzazioni, in modo tale da sapere quale prodotto utilizzare e quali superfici devono essere pulite nel giorno corrente. A questo punto è possibile prendere lo spazzolone ed accedere al locale G. in uscita, invece, occorre procedere alla pulizia utilizzando i prodotti sanitizzanti depositati e una volta terminate le procedure si deve lasciare lo spazzolone nel locale, firmare il foglio del calendario e togliere il foglio utilizzato dal tappetino adesivo.

- Locali M e L: una volta entrati nel locale L, bisogna fermarsi sul tappeto adesivo, indossare la cuffia, il camice verde, i calzari e i guanti posizionati sullo scaffale, al fine di procedere con le operazioni di pulizia come da calendario.
I prodotti che devono essere utilizzati sono posizionati nel locale stesso.
Dopo aver terminato le procedure, in uscita, si deve togliere il foglio utilizzato dal tappeto adesivo.

3.3.3 Cleaning delle apparecchiature e degli strumenti

In continuità con la gestione delle procedure di pulizia dei locali, anche le procedure di *cleaning* delle apparecchiature e degli strumenti seguono delle istruzioni operative aziendali (SOP) specifiche:

- Incubatori: prevede una pulizia ordinaria che viene effettuata, ad incubatore vuoto, ogni 30-40 giorni, basandosi sui tempi di produzione e consiste nel prelevare l'acqua dal fondo inclinato dell'incubatore, spruzzare lo sporicida su un panno, passarlo su tutte le superfici e i ripiani e lasciarlo agire per il tempo di contatto specifico. In seguito, si deve spruzzare Alcool isopropilico al 70% su un nuovo panno e passarlo su tutte le superfici. Inoltre, per le pareti interne occorre prestare particolare attenzione alle sonde di temperatura, CO₂ ed umidità.
Una pulizia estensiva da effettuare dopo interventi di manutenzione all'interno dello strumento oppure, in caso di contaminazione batterica.
Infine, una pulizia straordinaria che deve essere effettuata in caso di un evidente contaminazione da miceti che consiste nella sterilizzazione dello strumento avviando il programma previsto dall'apparecchiatura stessa.
- Centrifughe: prevede una pulizia ordinaria che consiste nello spruzzare il biocida E su un panno così da poter pulire l'interno degli alloggiamenti, consentire al prodotto di agire per 10 minuti ed in seguito, spruzzare Alcool isopropilico al 70% su un nuovo panno e pulire l'interno degli alloggiamenti.
Una pulizia straordinaria da effettuare in caso di travaso.
- Frigoriferi: sono utilizzati, attraverso l'uso di panni sterili, il detergente neutro e a seguire l'Alcool isopropilico al 70%. Deve essere eseguita annualmente, alternando il frigorifero uno al secondo, rimuovendo gli eventuali reagenti presenti.

- Congelatore: la procedura prevede di rimuovere i campioni e i reagenti conservati all'interno e trasferirli in un congelatore di back-up, di spegnere lo strumento, mediante l'interruttore apposito, e di scollegarlo dalla corrente. L'eccesso di ghiaccio, presente nello strumento, deve essere eliminato utilizzando, se necessario, una spatola di plastica e il congelatore deve essere lasciato spento e con gli sportelli aperti fino allo scongelamento di tutto il ghiaccio presente. In seguito, dopo essersi accertati sulle condizioni di usura delle guarnizioni, è possibile pulire le superfici dello strumento attraverso un panno imbevuto d'acqua. L'Alcool isopropilico al 70% deve essere lasciato ad agire sulle superfici per 3-5 minuti, dopodiché è necessario utilizzare un panno pulito sulle superfici.

Infine, è possibile ripristinare il collegamento elettrico e accendere, nuovamente lo strumento, in modo tale, da riposizionare i campioni e i reagenti al suo interno.

- Cappa: dopo aver completato le procedure di lavorazione, le superfici devono essere pulite con il detergente neutro, quindi passare il biocida A e il biocida E, secondo quanto indicato dalle procedure operative aziendali (SOP) che regolano l'alternanza dei biocidi. Il biocida A deve essere lasciato ad agire per 5 minuti, mentre il biocida E per 10 minuti. Passare, infine, il panno spruzzato con Alcool isopropilico al 71%. La pulizia estensiva deve essere effettuata in caso di manutenzione o dopo, un periodo di fermo prolungato, mentre, la pulizia ordinaria in caso di travaso.
- Bagno termostato: deve essere svuotato e pulito dopo ogni utilizzo e prima di poter procedere con le operazioni, si deve spegnere l'unità, disconnettere il cavo di alimentazione della presa elettrica e attendere il completo raffreddamento, prestando particolare attenzione ad evitare che l'umidità entri nel circolatore. In seguito, si deve sollevare il bagno termostato, utilizzando entrambe le maniglie, e svuotarlo nell'apposito contenitore da 1000 µl. A questo punto, è possibile procedere spruzzando, su un panno a basso rilascio di particelle, il biocida E per pulire l'interno dello strumento. Dopo 10 minuti, utilizzati per far agire il biocida E, deve essere spruzzato l'Alcool isopropilico al 70% su un nuovo panno, sempre a basso rilascio particellare, per pulire l'interno dello strumento.
Dopo interventi di manutenzione, prima di eseguire la pulizia con il biocida, si deve utilizzare il detergente neutro sterile.
- Microscopio: l'operatore, prima e dopo ogni utilizzo, deve pulire delicatamente il tavolino portaoggetti con un panno a basso rilascio particellare sterile, leggermente imbevuto con Alcool isopropilico al 70%

- Saldatrice *Syms III*: al termine delle operazioni di infialamento, con la saldatrice in classe A, bisogna procedere con la sanificazione mediante l'utilizzo di un panno imbevuto con l'Alcool isopropilico al 70%. Al termine, la saldatrice deve essere inserita nella busta sterile, applicando un'etichetta come sigillo.

Lo strumento imbustato è riposizionato sul ripiano inferiore del carrello nel locale I.

Inoltre, è fondamentale sostituire le pinze saldanti, ogni 3000 saldature, per garantirne la qualità.

In definitiva, l'efficacia delle operazioni di pulizia dei locali classificati, delle apparecchiature e degli strumenti è correlata, inoltre, alla loro rigorosa tracciabilità e documentazione. Infatti, registrare ogni intervento garantisce che le operazioni sanificanti sono attuate nel rispetto dei calendari previsti e secondo opportuni schemi di rotazione degli agenti disinfettanti, così da prevenire l'insorgenza di ceppi di microrganismi resistenti.

3.4 Convalida disinfettante

L'oggetto principale del presente lavoro è rappresentato dalla convalida dei disinfettanti, il cui scopo è quello di misurare l'efficacia microbica del prodotto in esame. In particolare, lo studio si è focalizzato sulla validazione del disinfettante *Klercide Low Residue Quat*, secondo le norme UNI EN 13727:2014 e UNI EN 13624:2013, con il fine di verificarne l'idoneità per l'impiego operativo presso l'officina farmaceutica *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo.

Il disinfettante *Klercide Low Residue Quat* è un biocida a base di ammonio quaternario e acqua, il quale è particolarmente indicato per l'impiego su tutte le tipologie di superfici all'interno delle camere sterili, degli ambienti classificati e delle apparecchiature. Per poter considerare il prodotto convalidato occorre riscontrare un abbattimento della concentrazione microbica iniziale di almeno 5 unità logaritmiche per la valutazione dell'attività battericida, ed almeno 4 unità logaritmiche per quella lieviticida.

Tali parametri sono stati verificati analizzando le seguenti condizioni sperimentali:

- Valutazione della crescita microbica in assenza del disinfettante;
- Efficacia diretta del disinfettante *Klercide Low Residue Quat*;
- Attività del disinfettante in presenza di un agente neutralizzante (*Tween 20*);
- Attività del disinfettante in presenza di un agente interferente (albumina sierica umana).

L'impiego di un agente neutralizzante e di un interferente risulta fondamentale, poiché il processo di convalida deve essere condotto sulla base delle condizioni operative del “*worst case*”, in modo tale da garantire la sicurezza, l'efficacia, e quindi la validità del formulato stesso. A tal proposito sono stati utilizzati il *Tween* 20 come agente neutralizzante, mentre come agente interferente l'albumina sierica umana (HSA):

- Il *Tween* 20, detto anche polisorbato 20, è un tensioattivo non ionico a pH neutro (7.45 al 5% in acqua) in grado di neutralizzare l'efficacia del disinfettante stesso, poiché, anche se utilizzato a basse concentrazioni (soluzioni allo 0.5-2%), è in grado di formare delle soluzioni con elevate proprietà emulsionanti, detergenti e solubilizzanti.
- L'albumina sierica umana (HSA) rappresenta la proteina più abbondante nel plasma umano, e nei terreni per colture cellulari, agisce legando e cedendo molecole essenziali alle linee cellulari. Nel contesto dei test di convalida viene impiegata come agente interferente in quanto riduce l'efficacia del disinfettante stesso. Tale sostanza è stata scelta in modo tale da simulare le condizioni operative di produzione, in quanto è ampiamente utilizzata nei reparti produttivi della *Cell Factory* con una concentrazione d'uso del 5% (concentrazione utilizzata anche nel test di convalida).

3.4.1 Scelta dei microrganismi e delle superfici da testare

La fase preliminare della convalida del disinfettante è rappresentata dalla scelta dei microrganismi e delle superfici da testare. Per la validazione della capacità battericida e lieviticida del disinfettante *Klarcide Low Residue Quat* sono stati utilizzati dei ceppi rappresentativi (**tabella 11**), selezionati sia in base ai diversi profili di resistenza intrinseca agli agenti biocidi, sia alla loro presenza all'interno dei locali classificati della *Cell Factory*.

Microrganismi utilizzati
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)
<i>Brevibacterium casei</i> (Ceppo endogeno)
<i>Candida parapsilosis</i> (Ceppo endogeno)

Tabella 11: ceppi rappresentativi utilizzati.

In particolare, i ceppi di *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, rappresentativi dei batteri gram-positivi e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, rappresentativi dei batteri gram-negativi, provengono dalla “libreria” di ceppi ATCC (*American Type Culture Collection*), forniti dalla Farmacopea Europea [28], mentre i ceppi di *Brevibacterium casei*, rappresentativi dei batteri gram-positivi e *Candida parapsilosis*, rappresentativi dei miceti, sono stati selezionati in seguito ai risultati della *trend analysis* dei ceppi isolati dai campionamenti ambientali delle aree classificate della *Cell Factory* nell'anno 2024.

Inoltre, poiché l'attività biocida di un disinfettante può essere influenzata dalle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali con cui entra in contatto, la convalida è stata condotta su parti di superfici maggiormente presenti all'interno dell'officina farmaceutica stessa. Nello specifico, le superfici testate comprendono:

- Acciaio: superfici di processo e numerose apparecchiature utilizzate nella produzione;
- Linoleum: superficie rappresentativa dei pavimenti dei locali classificati, corridoi e zone di vestizione;
- Vetro: superfici di contenitori, pareti delle cappe e alcuni strumenti utilizzati;

- Plastica: superficie rappresentativa di impianti e arredi come, ad esempio, vaschette, contenitori, visiere;
- Lattice: rappresentativo dei guanti utilizzati dagli operatori.

3.4.2 Preparazione delle sospensioni ottenute dal ceppo di partenza

Per ogni microrganismo scelto, il saggio di convalida richiede la preparazione di una sospensione in 4.5 ml di fisiologica, ottenuta attraverso il ceppo di partenza stesso e con una torbidità, misurata tramite nefelometro (**figura 16**), pari a 5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ CFU/ml) per quanto riguarda i ceppi batterici, mentre per i miceti una sospensione pari a 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), ottenuta mediante una diluizione 1:10 della sospensione madre 5 McFarland e misurata attraverso lo stesso strumento.



Figura 16: nefolometro.

Al fine di verificare l'accuratezza dell'inoculo, devono essere allestite delle diluizioni decimali seriali, ottenute aggiungendo 1ml della sospensione iniziale 5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ CFU/ml) di ogni ceppo batterico e 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) del ceppo fungino in 9 ml di fisiologica fino a raggiungere una concentrazione stimabile di 10^2 CFU/ml. In seguito, 100 μ l delle ultime due diluizioni ottenute devono essere piastrate in doppio su agar sangue e incubate a 35°C per un tempo che varia tra le 24 e le 48 ore. Trascorso il tempo stabilito le piastre devono essere rimosse dall'incubatore e, a questo punto, è possibile conteggiare le colonie (**figura 17**): la media del numero di colonie ottenute moltiplicate per il fattore di diluizione rappresenta la concentrazione microbica della sospensione del ceppo di partenza (N).

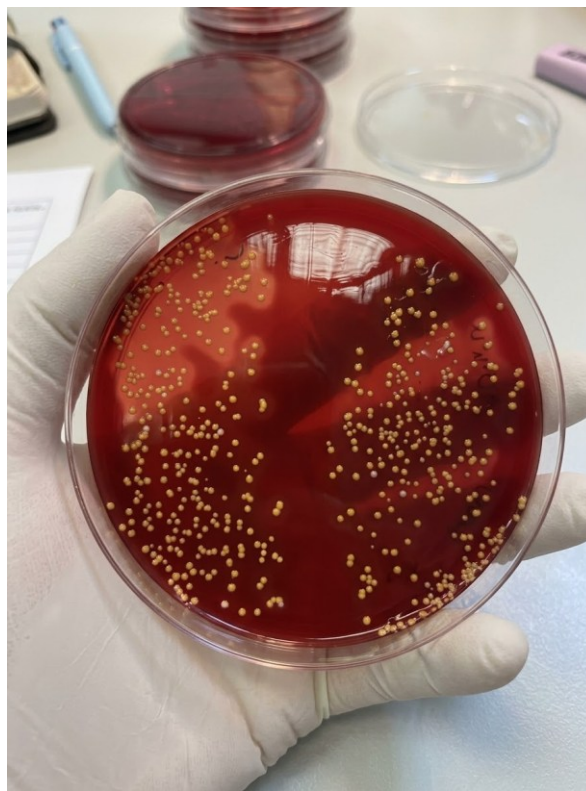


Figura 17: colonie di microrganismi cresciute su piastre Agar Sangue.

4. RISULTATI

Per ciascun ceppo utilizzato negli esperimenti di convalida è stata allestita una sospensione pari a 5 McFarland (1.5×10^9 CFU/ml) per le specie batteriche e 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml) per la specie fungina. Le sospensioni sono state allestite con diluizioni decimali seriali da 10^9 a 10^2 e le ultime 2 diluizioni sono state piastrate in doppio per verificare l'accuratezza dell'inoculo. La media del numero di colonie ottenuta moltiplicata per il fattore di diluizione rappresenta la concentrazione microbica della sospensione del ceppo di partenza (N).

Al termine dei tempi stabiliti, è stato possibile procedere con la determinazione della concentrazione microbica residua, così da poter valutare il numero di batteri (o funghi) vitali recuperabili dalle superfici testate alla fine dell'esperimento. A tal proposito, per ogni condizione, sono stati effettuati dei lavaggi in soluzione fisiologica di ogni superficie testata, in modo tale da permettere il rilascio degli eventuali microrganismi rimasti adesi alle superfici. Ogni superficie è stata posizionata in una provetta *Falcon* da 50 ml contenente 10 ml di soluzione fisiologica e agitate in un vortex, alla massima potenza dello strumento, per 10 minuti. Successivamente, con il fine di ottenere una determinazione diretta, per ogni condizione, sono stati seminati in doppio su piastre agar sangue 100 μ l della sospensione e le piastre sono state incubate per un tempo di 24/48 ore a 35°C.

Inoltre, per ognuna delle quattro condizioni della procedura di convalida, sono state allestite delle diluizioni seriali, così da permettere un conteggio più accurato delle colonie. Infatti, la semina del campione puro in presenza di cariche elevate determinerebbe la formazione di un "tappeto microbico", rendendo impossibile il conteggio delle colonie stesse, la serie di diluizioni ha permesso di ridurre gradualmente la concentrazione microbica così da ottenere delle colonie isolate e contabili. A tal proposito, per le condizioni in presenza del disinfettante, sono state allestite, partendo dalla sospensione di lavaggio in fisiologica, una serie di tre diluizioni seriali 1:10, sia per i ceppi batterici che per il ceppo fungino, e seminati, in doppio, 100 μ l su piastre Agar Sangue, le quali, in seguito, sono state incubate a 35°C per un periodo tra le 24 e 48 ore.

Mentre, per la valutazione della *Recovery* (prima condizione: controllo in assenza del disinfettante), sono state allestite, a partire dalla sospensione di lavaggio in fisiologica, una serie di cinque diluizioni seriali 1:10, per i ceppi batterici, e una serie di quattro diluizioni seriali 1:10, per il ceppo fungino, e seminati, in doppio, 100 μ l delle ultime due diluizioni su piastre Agar Sangue, le quali sono state incubate a 35°C per un periodo tra le 24 e 48 ore.

La media del numero di colonie ottenute moltiplicate per il fattore di diluizione costituisce la concentrazione microbica residua quantificata al termine della convalida (N_a).

4.1 Valutazione della crescita microbica in assenza del disinfettante

La determinazione della crescita microbica in assenza del disinfettante rappresenta una fase fondamentale per la procedura di convalida del disinfettante, infatti, ha lo scopo di quantificare e valutare il recupero o *Recovery* (N_a), cioè la capacità di recupero di ciascun microrganismo in relazione alla tipologia di superficie testata, ed è definito come il rapporto tra il numero di Unità Formanti Colonie (CFU/100 µl) (N_a) realmente osservate e il numero di Unità Formanti Colonie (CFU/100 µl) (N_0) attese, in relazione alla concentrazione della sospensione di partenza (N) (tabella 12).

Quest'analisi ci ha permesso di garantire che l'eventuale riduzione della carica riscontrata nelle fasi successive della convalida sia relazionata esclusivamente all'azione del disinfettante e non a perdite dovute all'adesione irreversibile dei microrganismi sulle superfici.

ACCIAIO					
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N_0 (CFU/100µl)	N_a (CFU/100µl)	$R_{(e)}$	Log $R_{(e)}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	7×10^7	2,29	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^7$	6,15	0,8
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	$8,3 \times 10^7$	2,17	0,3
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$	3,7	0,6
LINOLEUM					
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N_0 (CFU/100µl)	N_a (CFU/100µl)	$R_{(e)}$	Log $R_{(e)}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	6×10^7	2,67	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	$8,6 \times 10^7$	3,72	0,6
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7$	3,10	0,5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$7,1 \times 10^6$	3,5	0,5
VETRO					
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N_0 (CFU/100µl)	N_a (CFU/100µl)	$R_{(e)}$	Log $R_{(e)}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8×10^8	8×10^7	$1,2 \times 10^7$	6,7	0,82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^8$	10^7	29	1,46
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	10^7	11	1,04
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$3,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$	3,8	0,6
PLASTICA					
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N_0 (CFU/100µl)	N_a (CFU/100µl)	$R_{(e)}$	Log $R_{(e)}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9×10^8	9×10^7	$5,2 \times 10^7$	1,73	0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	$7,4 \times 10^7$	4,32	0,6
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$7,2 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	6,6	0,8
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$	5,9	0,8
LATTICE					
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N_0 (CFU/100µl)	N_a (CFU/100µl)	$R_{(e)}$	Log $R_{(e)}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8×10^8	8×10^7	$1,2 \times 10^7$	6,7	0,82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^8$	$9,5 \times 10^6$	30,5	1,48
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	10^7	11	1,04
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	$8,1 \times 10^6$	5,3	0,7

Tabella 12: Valutazione della crescita microbica in assenza del disinfettante.

N: Concentrazione microbica della sospensione ottenuta dal ceppo di partenza
 N0: Concentrazione microbica della sospensione effettiva usata per la conduzione della prova
 Na: Concentrazione microbica residua quantificata al termine della prova
 R(c): Fattore di riduzione della concentrazione microbica presente all'inizio e al termine della prova
 (R(c)=N0/Na) in assenza del disinfettante
 Log R(c): Logaritmo decimale del fattore di riduzione R(c)

Nello specifico, per la valutazione della *Recovery* (Na) sono stati spottati su ogni superficie da testare 100 µl (N0) della sospensione 5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ CFU/ml) per i ceppi batterici e 100 µl (N0) della sospensione 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) per il ceppo fungino e incubate a 35°C per un periodo tra le 24 e 48 ore, così da valutare la quantità teorica.

La recovery (Na) è rappresentata come numero di CFU/100 µl osservate rispetto al numero di CFU/100 µl attese (N0) in relazione alla concentrazione della sospensione di partenza (N). Nella *tabella 12* sono riportati i risultati della crescita microbica in assenza di disinfettante.

4.2 Efficacia diretta del disinfettante *Klarcide Low Residue Quat*

Per poter valutare l'efficacia diretta del disinfettante, e quindi, la sua attività, sono state spottate, su ogni superficie da testare, 100 µl della sospensione 5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ CFU/ml) per i ceppi batterici e 100 µl della sospensione 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) per il ceppo fungino, lasciando asciugare per un tempo massimo di 15 minuti.

In seguito, ogni superficie è stata trattata con il disinfettante *Klarcide Low Residue Quat*, aggiungendo 100 µl e lasciando agire per il tempo di contatto stabilito da produttore del disinfettante, in questo specifico caso per 5 minuti (*tabella 13*).

ACCIAIO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N0 (CFU/100µl)	Na (CFU/100µl)	R(d)	Log R(d)	E(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	17	$9,4 \times 10^6$	6,9	6,5	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	150	$2,1 \times 10^6$	6,3	5,5	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	121	$1,5 \times 10^6$	6,2	5,9	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	244	105	5	4,4	>4
LINOLEUM							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N0 (CFU/100µl)	Na (CFU/100µl)	R(d)	Log R(d)	E(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	110	$1,5 \times 10^6$	6,2	5,8	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	174,2	$1,8 \times 10^6$	6,3	5,7	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	140,3	$1,3 \times 10^6$	6,1	5,6	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	221	$1,1 \times 10^5$	5,1	4,6	>4

VETRO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	93	8,6 x 10 ⁵	5,9	5,2	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2,9 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁸	29,5	9,8 x 10 ⁶	7	5,5	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷	2,97	3,7 x 10 ⁶	6,6	5,6	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	3,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁷	323,2	9,9 x 10 ⁴	4,9	4,3	>4
PLASTICA							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9 x 10 ⁸	9 x 10 ⁷	87	9,2 x 10 ⁵	5,9	5,7	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,2 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁸	23,3	1,37 x 10 ⁷	7,1	6,5	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	7,2 x 10 ⁸	7,2 x 10 ⁷	92,3	7,8 x 10 ⁵	5,9	5,1	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	4,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁷	382,7	1,1 x 10 ⁵	5	4,2	>4
LATTICE							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	98	8,2 x 10 ⁵	5,9	5,2	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2,9 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁸	23,3	1,2 x 10 ⁷	7,1	5,6	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷	10	1,1 x 10 ⁶	6,04	5,1	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	4,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁷	374,6	1,2 x 10 ⁵	5,1	4,4	>4

Tabella 13: Valutazione crescita microbica in presenza del disinfettante Klercide low residue quat.

N: Concentrazione microbica della sospensione ottenuta dal ceppo di partenza

N₀: Concentrazione microbica della sospensione effettiva usata per la conduzione della prova

N_a: Concentrazione microbica residua quantificata al termine della prova

R_(d): Fattore di riduzione della concentrazione microbica presente all'inizio e al termine delle prove (R_(d)=N₀/N_a) in presenza del disinfettante

Log R_(d): Logaritmo decimale del fattore di riduzione R_(d)

E_(d): Reale efficacia dell'attività del disinfettante (Log R_(d) - Log R_(c))

4.3 Attività del disinfettante in presenza di un agente neutralizzante (Tween 20)

Per la valutazione dell'attività del disinfettante in presenza di agente neutralizzante (Tween 20) sono stati spottati, su ogni superficie da testare, 100 µl della sospensione 5 McFarland (1,5 x 10⁹ CFU/ml) per i ceppi batterici e 100 µl della sospensione 0.5 McFarland (1,5 x 10⁸ CFU/ml) per il ceppo fungino, e lasciate ad asciugare per un tempo massimo di 15 minuti. Successivamente, sono stati spottati 100 µl dell'agente neutralizzante. In seguito, ogni superficie è stata trattata con il disinfettante Klercide Low Residue Quat, aggiungendo 100 µl e lasciando agire per il tempo di contatto stabilito da produttore del disinfettante, in questo specifico caso per 5 minuti.

ACCIAIO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1,6 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁸	27	5,9 x 10 ⁶	6,8	6,4	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,2 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁸	188	1,7 x 10 ⁶	6,2	5,4	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,8 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁸	130	1,4 x 10 ⁶	6,1	5,8	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	2,5 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁷	173,2	1,4 x 10 ⁵	5,1	4,5	>4
LINOLEUM							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1,6 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁸	107,2	1,5 x 10 ⁶	6,2	5,8	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,2 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁸	164,6	1,9 x 10 ⁶	6,3	5,7	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,8 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁸	182,6	9,8 x 10 ⁵	5,9	5,4	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	2,5 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁷	164,1	1,5 x 10 ⁵	5,2	4,7	>4
VETRO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	105	7,6 x 10 ⁵	5,9	5,1	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2,9 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁸	52	5,6 x 10 ⁶	6,7	5,2	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷	8	1,4 x 10 ⁶	6,1	5,1	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	3,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁷	2256	1,4 x 10 ⁵	5,1	4,5	>4
PLASTICA							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9 x 10 ⁸	9 x 10 ⁷	119,3	7,5 x 10 ⁵	5,8	5,6	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,2 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁸	44,7	7,1 x 10 ⁵	5,8	5,2	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	7,2 x 10 ⁸	7,2 x 10 ⁷	84,5	8,5 x 10 ⁵	5,9	5,1	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	4,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁷	342,2	1,3 x 10 ⁵	5,1	4,3	>4
LATTICE							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8 x 10 ⁸	8 x 10 ⁷	102	7,8 x 10 ⁵	5,9	5,1	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2,9 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁸	55,1	5,2 x 10 ⁶	6,7	5,3	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁷	5	2,2 x 10 ⁶	6,3	5,3	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	4,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁷	354,6	1,2 x 10 ⁵	5,1	4,4	>4

Tabella 14: Valutazione crescita microbica in presenza del disinfettante Klercide low residue quat e di una sostanza neutralizzante (albumina umana).

N: Concentrazione microbica della sospensione ottenuta dal ceppo di partenza

N₀: Concentrazione microbica della sospensione effettiva usata per la conduzione della prova

N_a: Concentrazione microbica residua quantificata al termine della prova

R_(d): Fattore di riduzione della concentrazione microbica presente all'inizio e al termine delle prove (R_(d)=N₀/N_a) in presenza del disinfettante

Log R_(d): Logaritmo decimale del fattore di riduzione R_(d)

E_(d): Reale efficacia dell'attività del disinfettante (Log R_(d) - Log R_(c))

I risultati della crescita microbica in presenza del neutralizzante sono riportati nella *tabella 14*.

4.4 Attività del disinfettante in presenza di un agente interferente (albumina sierica umana)

Per la valutazione dell'attività del disinfettante in presenza di agente interferente (Albumina sierica umana) sono state spottate, su ogni superficie da testare 100 µl della sospensione 5 McFarland ($1,5 \times 10^9$ CFU/ml) per i ceppi batterici e 100 µl della sospensione 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) per il ceppo fungino. Dopo asciugatura per un tempo massimo di 15 minuti, sono stati spottati 100 µl dell'agente interferente. In seguito, ogni superficie è stata trattata con il disinfettante *Klercide Low Residue Quat*, aggiungendo 100 µl e lasciando agire per il tempo di contatto stabilito da produttore del disinfettante, in questo specifico caso per 5 minuti.

I risultati sono riportati nella *tabella 15*.

ACCIAIO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	160	10^6	6	5,6	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	172	$1,9 \times 10^6$	6,3	5,5	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	117	$1,5 \times 10^6$	6,2	5,9	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	183,4	$1,4 \times 10^5$	5,2	4,6	>4
LINOLEUM							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	111,2	$1,4 \times 10^6$	6,1	5,7	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	201,1	$1,6 \times 10^6$	6,2	5,6	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	194,2	$9,3 \times 10^5$	5,9	5,4	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	143,2	$1,8 \times 10^5$	5,3	4,8	>4
VETRO							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8×10^8	8×10^7	75,5	$1,1 \times 10^6$	6,02	5,2	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^8$	58,5	5×10^6	6,7	5,2	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	6	$1,8 \times 10^6$	6,3	5,3	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$3,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	221,3	$1,5 \times 10^5$	5,2	4,6	>4
PLASTICA							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9×10^8	9×10^7	125,2	$7,2 \times 10^5$	5,8	5,6	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$3,2 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$	52,6	$6,1 \times 10^6$	6,7	6,1	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$7,2 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$	75,3	$9,6 \times 10^5$	5,9	5,1	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	301,4	$1,4 \times 10^5$	5,1	4,3	>4
LATTICE							
CEPPO ATCC/ENDOGENO	N (CFU/ml)	N ₀ (CFU/100µl)	N _a (CFU/100µl)	R _(d)	Log R _(d)	E _(d)	Limite di accettabilità
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8×10^8	8×10^7	118,1	$6,8 \times 10^5$	5,8	5,01	>5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^8$	56,7	$5,1 \times 10^6$	6,7	5,2	>5
<i>Brevibacterium casei</i> endogeno	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	4	$2,8 \times 10^6$	6,4	5,4	>5
<i>Candida parapsilosis</i> endogeno	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$	327,8	$1,3 \times 10^5$	5,1	4,4	>4

Tabella 15: Valutazione crescita microbica in presenza del disinfettante *Klercide low residue quat* e di una sostanza interferente (*Tween 20*).

N: Concentrazione microbica della sospensione ottenuta dal ceppo di partenza
N0: Concentrazione microbica della sospensione effettiva usata per la conduzione della prova
Na: Concentrazione microbica residua quantificata al termine della prova
R(d): Fattore di riduzione della concentrazione microbica presente all'inizio e al termine delle prove
($R(d)=N0/Na$) in presenza del disinfettante
Log R(d): Logaritmo decimale del fattore di riduzione R(d)
E(d): Reale efficacia dell'attività del disinfettante ($\text{Log } R(d) - \text{Log } R(c)$)

Nei test di convalida eseguiti sulle 5 superfici contaminate con ciascuna delle 4 specie microbiche, il prodotto disinfettante “*Klercide Low Residue Quat*” ha mostrato una efficacia dell'attività battericida e lieviticida, in termini di capacità di riduzione del numero di microrganismi (logR), superiore al limite di accettabilità previsto dalla normativa.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La convalida dell'efficacia dei disinfettanti rappresenta uno degli elementi cardine del sistema di controllo della contaminazione (Contamination Control Strategy, CCS) richiesto per le officine di produzione di ATMP [14]. In assenza di un processo di sterilizzazione terminale, l'intero processo produttivo si fonda sulla capacità delle aree classificate di mantenere requisiti microbiologici stringenti, e tale capacità dipende in larga misura dall'efficacia dimostrata dei prodotti sanificanti impiegati per il trattamento di superfici, attrezzature e componenti critici. Il lavoro di tesi aveva lo scopo di eseguire lo studio di convalida sul sanitizzante *Klercide Low Residue Quat*, un disinfettante a base di sali di ammonio quaternario a basso residuo, valutandone la coerenza metodologica, la rappresentatività delle condizioni di prova rispetto al contesto reale d'uso e l'adeguatezza dei risultati ottenuti rispetto ai criteri di accettazione attesi per un impianto destinato alla produzione di terapie avanzate. Lo studio nasceva da un'esigenza specifica: la sostituzione del biocida precedentemente in uso, *Klercide Quat/Biguanide*, con il nuovo prodotto *Klercide Low Residue Quat*. Ogni variazione di un agente sanitizzante impiegato in aree classificate costituisce, a tutti gli effetti, una modifica critica del sistema di controllo della contaminazione e richiede pertanto una convalida ad hoc, in grado di dimostrare che il nuovo prodotto garantisca un'efficacia antimicrobica quantomeno equivalente, se non superiore, a quella del biocida sostituito, prima della sua introduzione in produzione [5]. È opportuno precisare, inoltre, che il *Klercide Low Residue Quat* non è destinato a un impiego esclusivo, bensì a un utilizzo in rotazione con altri tre agenti sanificanti già in uso presso il sito: il *Klercide Sporocidal Active Chlorine*, a base di cloro attivo, l'alcol isopropilico al 70% e un detergente non ionico a basso residuo. La convalida in oggetto va pertanto letta e discussa non come valutazione di un prodotto isolato, ma come tassello di un programma di rotazione articolato, la cui efficacia complessiva dipende dalla coerenza e dalla complementarità dei diversi agenti impiegati, ciascuno chiamato a coprire un differente spettro d'azione o una differente esigenza operativa.

Lo studio ha previsto la determinazione dell'attività antimicrobica del disinfettante nei confronti di un pannello di microrganismi selezionati, applicato su cinque tipologie di superfici rappresentative dell'ambiente e del processo di produzione, in presenza sia di un agente neutralizzante (*Tween 20*) sia di una sostanza interferente (albumina sierica umana), a simulare condizioni di sporco organico. I risultati ottenuti hanno mostrato una riduzione della carica microbica superiore a 5 log₁₀ per i ceppi batterici e superiore a 4 log₁₀ per i ceppi fungini, valori che, come discusso nel seguito, risultano ampiamente in linea con le aspettative

regolatorie. Il protocollo di convalida è stato impostato secondo un approccio riconducibile agli standard EN 13697 e EN 1276, che disciplinano rispettivamente la determinazione dell'attività battericida e fungicida/levuricida di base dei disinfettanti chimici su superfici non porose, in condizioni che simulano l'uso pratico. La scelta di condurre le prove sia in presenza di neutralizzante sia di interferente organico costituisce un punto metodologico rilevante e va sottolineata positivamente: il neutralizzante consente infatti di arrestare l'azione del principio attivo al termine del tempo di contatto stabilito, evitando che l'attività antimicrobica residua del disinfettante prosegua durante la fase di campionamento e falsi conseguentemente il conteggio delle unità formanti colonia sopravvissute. Senza un'adeguata neutralizzazione, il rischio è quello di sovrastimare l'efficacia del prodotto, ottenendo risultati non rappresentativi della reale capacità battericida/fungicida.

L'impiego dell'albumina come agente interferente riproduce invece condizioni di "sporco", più cautelative rispetto alle condizioni pulite e maggiormente rappresentative dello scenario peggiore (*worst case*) realisticamente atteso in un'area di produzione, dove le superfici possono presentare residui organici di natura proteica derivanti dalla manipolazione di materiale biologico, reagenti o materiali di consumo. La dimostrazione dell'efficacia in presenza di carico organico rafforza quindi la robustezza della convalida, poiché attesta che l'azione disinfettante non viene sostanzialmente compromessa da una matrice interferente, riducendo il rischio di sottostima dell'efficacia in condizioni operative reali.

Merita infine un commento la scelta stessa del prodotto sostitutivo. Il passaggio da una formulazione *Quat/Biguanide* a una formulazione *Quat* a basso residuo ("*Low Residue*") risponde tipicamente all'esigenza di ridurre l'accumulo di film residui sulle superfici trattate a seguito di applicazioni ripetute, aspetto particolarmente critico in un contesto di produzione di ATMP, dove eventuali residui chimici possono rappresentare un fattore di rischio per la qualità del prodotto biologico (ad esempio per contatto indiretto o per interferenza con saggi di controllo) e possono inoltre fungere da substrato favorente la persistenza microbica se non adeguatamente rimossi. La convalida condotta, dimostrando un'efficacia antimicrobica quantomeno sovrapponibile a quella generalmente attesa da un disinfettante a base di ammonio quaternario, supporta quindi la scelta di adottare una formulazione a minor impatto residuo senza compromettere la capacità biocida del prodotto.

Il pannello microbico impiegato è ben bilanciato e coerente con le indicazioni delle linee guida di riferimento, in particolare con quanto suggerito dall'*Annex 1* delle GMP Europee (revisione 2022), che raccomanda l'inclusione, accanto ai ceppi di riferimento farmacopeici, di isolati

ambientali propri del sito produttivo, al fine di verificare l'efficacia del disinfettante anche nei confronti della flora microbica effettivamente riscontrata durante il monitoraggio ambientale di routine. La combinazione di ceppi standardizzati e ceppi endogeni consente quindi di soddisfare in modo bilanciato sia l'esigenza di confrontabilità con gli standard normativi, sia l'esigenza di rappresentatività rispetto alla reale pressione di contaminazione del laboratorio, elemento particolarmente apprezzato in sede di ispezione regolatoria.

La scelta di testare il disinfettante su cinque materiali differenti (acciaio, linoleum, vetro, plastica e lattice) risponde all'esigenza di dimostrare l'efficacia del prodotto sull'intera gamma di materiali effettivamente presenti nelle aree di produzione, tenendo conto delle differenze di porosità, rugosità superficiale e interazione chimico-fisica con il principio attivo che possono influenzare il tempo di contatto reale e, di conseguenza, l'efficacia disinfettante. La rappresentatività delle superfici testate appare pertanto adeguata a coprire le principali interfacce con cui il disinfettante entra in contatto durante le operazioni di sanificazione di routine, includendo sia superfici rigide e non porose (acciaio, vetro) sia superfici con caratteristiche più critiche in termini di adesione e rimozione dei microrganismi (linoleum, plastica, lattice). Si segnala che il lattice, in particolare, costituisce una superficie di interesse peculiare poiché riconducibile ai dispositivi di protezione individuale (guanti) utilizzati dall'operatore durante le manipolazioni a settiche, la cui sanificazione efficace concorre direttamente alla riduzione del rischio di contaminazione crociata del prodotto in lavorazione.

I risultati riportati, con riduzioni superiori a 5 log₁₀ per i ceppi batterici (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. casei*) e superiori a 4 log₁₀ per il ceppo fungino (*C. parapsilosis*), risultano superiori ai criteri di accettazione comunemente adottati nel settore, generalmente fissati in una riduzione minima di 5 log₁₀ per l'attività battericida e di 4 log₁₀ per l'attività fungicida/levuricida secondo gli standard EN 1276 ed EN 1650 [30] [31]. Il margine di sicurezza dimostrato è quindi buono e costituisce un elemento di robustezza dello studio, in particolare considerando che i test sono stati condotti in condizioni "sporche", ossia nello scenario più sfavorevole per l'attività del prodotto. È inoltre rilevante osservare che l'attività fungicida, sebbene inferiore in valore assoluto rispetto a quella battericida (4 log₁₀ contro 5 log₁₀), è comunque coerente con il comportamento atteso per i disinfettanti a base di ammonio quaternario, generalmente caratterizzati da un'efficacia leggermente più contenuta nei confronti dei lieviti rispetto ai batteri vegetativi, a causa delle differenze strutturali della parete cellulare fungina. Il valore ottenuto risulta comunque ampiamente conforme e non richiede azioni correttive.

Un ulteriore elemento a supporto della validità dello studio è rappresentato dalla coerenza dei risultati ottenuti tra i diversi tipi di superficie testati: l'assenza di scostamenti significativi tra i valori di riduzione logaritmica osservati su acciaio, linoleum, vetro, plastica e lattice suggerisce che il disinfettante mantiene un'efficacia sostanzialmente uniforme indipendentemente dalla natura della superficie trattata, elemento particolarmente rilevante in un contesto produttivo caratterizzato dalla presenza di materiali eterogenei.

I risultati della convalida forniscono evidenza documentata a supporto dell'idoneità del disinfettante *Klervide Low Residue Quat* quale agente sanificante di routine nell'ambito della *Contamination Control Strategy* del laboratorio di produzione ATMP, in linea con quanto richiesto dall'*Annex 1 GMP* e dalle linee guida PIC/S (PI 007) in materia di convalida dei disinfettanti impiegati in aree classificate [17]. Un elemento di particolare solidità del programma di sanificazione del sito è rappresentato dal fatto che il prodotto non è destinato a un uso esclusivo, ma si inserisce in uno schema di rotazione già strutturato, che prevede l'impiego alternato di quattro agenti dal meccanismo d'azione differenziato. L'adozione di uno schema di rotazione multi-agente, anziché l'impiego esclusivo del *Klervide Low Residue Quat*, risulta pienamente coerente con le raccomandazioni dell'*Annex 1 GMP*, secondo cui l'utilizzo di un singolo principio attivo disinfettante non è generalmente ritenuto sufficiente a garantire un controllo microbiologico completo nel tempo, per il rischio di selezione di popolazioni microbiche tolleranti o resistenti. In quest'ottica, la convalida del *Klervide Low Residue Quat* qui commentata va quindi intesa come qualifica di uno specifico tassello di un sistema più ampio, la cui efficacia complessiva è affidata alla combinazione complementare dei quattro agenti: il controllo di routine della carica vegetativa batterica e fungina da parte del Quat a basso residuo, il periodico abbattimento delle forme sporigene da parte dell'agente clorossidante, l'azione rapida e a largo raggio d'impiego dell'alcol isopropilico e l'azione detergente/rimozione residui del detergente non ionico.

L'efficacia dimostrata in laboratorio attraverso gli esperimenti di convalida andrà confermata nel tempo attraverso il monitoraggio ambientale di routine, valutando l'andamento dei trend di contaminazione e l'eventuale comparsa di isolati non coperti dal pannello di convalida, i quali dovrebbero essere periodicamente caratterizzati e, se ricorrenti o di particolare rilevanza, inclusi in successivi studi di verifica dell'efficacia del disinfettante (*challenge test* mirati). Analogamente, si prevede una rivalidazione periodica del disinfettante in occasione di eventuali modifiche significative alla formulazione del prodotto (come nel caso attuale), al layout delle aree classificate o ai materiali costruttivi delle superfici.

Nel complesso, lo studio di convalida presentato risulta metodologicamente solido e coerente con gli standard di riferimento del settore, e appare pienamente adeguato a supportare la decisione di sostituire il precedente biocida *Klercide Quat/Biguanide* con il *Klercide Low Residue Quat*. Il disegno sperimentale, che ha previsto l'impiego di ceppi sia farmacopeici sia endogeni, la valutazione su cinque superfici rappresentative dell'ambiente produttivo e la conduzione delle prove in presenza di interferente organico e di adeguato agente neutralizzante, consente di attribuire ai risultati ottenuti un elevato grado di affidabilità e rappresentatività rispetto alle reali condizioni d'uso.

Le riduzioni logaritmiche osservate, superiori a 5 log10 per i batteri e a 4 log10 per i lieviti, soddisfano ampiamente i criteri di accettazione richiesti, confermando l'idoneità del nuovo sanitizzante a garantire un'efficacia quantomeno equivalente a quella del prodotto sostituito, con il vantaggio aggiuntivo di un minor impatto residuo sulle superfici trattate. Tale idoneità risulta ulteriormente rafforzata dal fatto che il *Klercide Low Residue Quat* non opera in isolamento, bensì all'interno di un programma di rotazione strutturato insieme al *Klercide Sporicidal Active Chlorine*, all'alcol isopropilico al 70% e al detergente non ionico a basso residuo, schema che, coprendo in modo complementare sia l'attività vegetativa sia quella sporicida, sia le esigenze di disinfezione rapida sia quelle di rimozione dei residui, risulta pienamente allineato alle aspettative dell'*Annex 1 GMP* in tema di gestione robusta e diversificata dei sanitizzanti nelle aree classificate destinate alla produzione di ATMP [17].

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Kakroodi, F. A., Khodadoust, E., Alizadeh, M., Tehrani, R. S. H., Sarabi, P. A., Rahmanian, M., & Vosough, M. (2025). Current challenges and future directions of ATMPs in regenerative medicine. *Regenerative Therapy*, 30, 358-370.
- 2 Magrelli, F. M., Merra, A., & Pellegrini, G. (2020). Surgery versus ATMPs: an example from ophthalmology. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 440.
- 3 Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). Accesso al farmaco - Terapie Avanzate. <https://www.aifa.gov.it/terapie-avanzate> (Ultimo accesso: 20/08/2026)
- 4 European Medicines Agency (EMA). Medicinal Products – Eudralex volume 4. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en
- 5 European Medicines Agency (EMA). Guidelines on Good Manufacturing Practice for Advanced Therapy Medicinal Products. https://health.ec.europa.eu/document/download/e1786e5d-1587-42af-b8ff-6a810ccb6836_en?filename=pharm731_2ib_atmps_guidelines.pdf
- 6 International Standard (ISO) 14644-2. Cleanrooms and associated controlled environments — Part 2: Monitoring to provide evidence of cleanroom performance related to air cleanliness by particle concentration. Second edition 2025-12-15. <https://antoandoluong.com/Files/Docs/20203181613304.pdf>
- 7 Ciccocioppo R, Comoli P, Astori G, et al. Developing cell therapies as drug products. *Br J Pharmacol*. 2021;178(2):262-279. doi:10.1111/bph.15305
- 8 The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4 EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 1, 22.08.2022. https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf
- 9 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare](https://www.edqm.eu/en/). <https://www.edqm.eu/en/> (ultimo accesso: 30/08/2026)
- 10 Quality Assurance Accademy <https://www.qacademyproject.com/assicurazione-qualita-o-controllo-qualita/> (Ultimo accesso: 01/08/2026)

- 11 EUROGCT <https://www.eurogct.org/it/research-pathways/research-and-innovation/fundamental-research/manufacturing-phase/produzione-e> (Ultimo accesso: 01/08/2026)
- 12 European Medicines Agency: Guideline On Human Cell-Based Medicinal Products. [Online] 21 May 2008. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf. (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 13 Cevibra - Advanced Therapy Medicinal Products. <https://www.cevibra.com/advanced-therapy-medicinal-products/> (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 14 Gee, A. P. (Ed.). (2021). *Cell therapy: cGMP facilities and manufacturing*. Springer Nature.
- 15 International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use – ICH Q7. Forth edition 2000-11-10. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf> (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 16 Environment and Quality of Life - Biological Particles in Indoor Environments, Commission of European Communities Report n. 12, 14988 EN (2009). https://cordis.europa.eu/docs/results/502/502671/126459681-6_en.pdf (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 17 EudraLex - The Rules Governing Medicinal Products in the European Union - Volume 4 – Annex 1. https://health.ec.europa.eu/document/download/e05af55b-38e9-42bf-8495-194bbf0b9262_en?filename=20220825_gmp-an1_en_0.pdf (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 18 Scotti, C. (2021). (2022) - Considerazioni pratiche per la prevenzione della cross contamination: la cleaning validation chimica. Ascca News n.3.
- 19 International Society for Pharmaceutical Engineering. *Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products: A Guide to Managing Risks Associated with Cross-Contamination*. Baseline Guide Vol 7, 2nd edition 2017. ISPE, Tampa, FL, 186.
- 20 Pharmaceutical Inspection Convention (PICS). Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities (2018). <https://picscheme.org/docview/2467> (Ultimo accesso: 30/08/2026)

- 21 Pharmaceutical Inspection Convention (PICS). Inspection of health based exposure limit (HBEL) assessments and use in quality risk management (2020).
<https://picscheme.org/docview/1947> (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 22 APIC - Guidance on Aspects of Cleaning Validation in Active Pharmaceutical Ingredient Plants; Feb. 2021.
https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/APIC_Cleaning-validation-guide_2021.pdf
(Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 23 Health Canada's Cleaning Validation Guide (GUI-0028), 2021.
<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/good-manufacturing-practices/validation/cleaning-validation-guidelines-guide-0028/document.html> (Ultimo accesso: 30/08/2026)
- 24 Sandle T (2017) Biodecontamination of cleanrooms and laboratories using gassing systems. Institute of Validation Technology.
<https://www.ivtnetwork.com/article/biodecontamination-cleanrooms-and-laboratories-using-gassing-systems>. (Ultimo accesso: 09/08/2026)
- 25 European Chemicals Agency (2016) Transitional guidance on efficacy assessment for product types 1-5, disinfectants.
https://echa.europa.eu/documents/10162/23492134/tg_efficacy_pt1-5_superseded_en.pdf/afac1df2-7cdc-acc6-ba98-e9a19ac126c3. (Ultimo accesso: 09/08/2026.)
- 26 U.S. Food and Drug Administration (2004) Sterile drug products produced by aseptic processing - Current good manufacturing practice. Guidance for Industry. September 2004.
<https://www.fda.gov/media/71026/download>. (Ultimo accesso: 09/08/2026)
- 27 European Commission Directorate General for Health and Food Safety (2015) EU guidelines for good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use annex 15: Qualification and validation.
https://health.ec.europa.eu/document/download/7c6c5b3c-4902-46ea-b7ab-7608682fb68d_en?filename=2015-10_annex15.pdf (Ultimo accesso: 09/08/2026)
- 28 European Pharmacopoeia . Versione corrente 2024.
<https://pheur.edqm.eu/home> (Ultimo accesso: 12/08/2026)

29 Istruzioni di ricostituzione e scheda tecnica DSMZ

<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/safety-instructions> (Ultimo accesso: 27/08/2026)

30 UNI EN 1276:2019. Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività battericida di disinfettanti chimici e antisettici usati in campo alimentare, industriale, domestico e istituzionale - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1) (2019)

31 UNI EN 1650:2019. Disinfettanti chimici ed antisettici - Prova quantitativa in sospensione per la valutazione di attività fungicida o levuricida di disinfettanti chimici e antisettici utilizzati in campo alimentare, industriale, domestico e istituzionale - Metodo di prova e requisiti (fase 2, stadio 1) (2019)