

**Título: MONITORIZACION DE PARTICULAS DE UNA SALA BLANCA:
REQUERIMIENTOS NORMATIVOS EN TERAPIAS AVANZADAS**

Galvez P, Ruiz MA, Soria B y Clares B*.

Patricia Gálvez Martín Doctorando, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Responsable Control de Calidad de La Unidad de Producción Celular del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Sevilla.

Beatriz Clares Naveros, Profesor Ayudante Doctor, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Bernat Soria Ecoms, Catedrático de Fisiología, Universidad Pablo Olavide, Sevilla.

M^a Adolfinia Ruíz Martínez, Catedrática, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

E-mail de la persona responsable de la comunicación: Patricia.galvez@cabimer.es

SOLICITUD DE COMUNICACIÓN ORAL

ABSTRACT

Clean rooms and clean air devices should be classified according to EN ISO 14644-1, cleaning categories in terms of particles in the air for cleanrooms and clean zones. Annex I of the GMP, which was published in March 2009, details the new considerations to make in the production of an advanced drug therapies, by monitoring the number of particles in the working environment of cleanroom. The aim of this paper tries to present a review of existing regulations on advanced therapies, focusing on the latest GMP Annex I, where a special mention to the control of airborne particles in a cleanroom for the production of advanced drug therapies. It defines the minimum monitoring points required to give at a validated production process.

RESUMEN

Las salas blancas y los dispositivos de aire limpio deben clasificarse según la norma EN ISO 14644-1, categorías de limpieza en cuanto a las partículas en el aire para las salas blancas y las zonas limpias. Las Normas de Correcta Fabricación (NCF) clasifican las zonas de trabajo de una sala blanca en diferentes grados según el número de partículas suspendidas en el ambiente. Cada operación de fabricación exige un grado adecuado de limpieza del entorno en estado de funcionamiento para minimizar los riesgos de contaminación microbiana o de partículas en el producto o los materiales que se estén manipulando. El anexo I de las NCF, publicado en marzo del 2009, detalla las nuevas consideraciones que se deben de hacer en la producción de un medicamento de terapias avanzadas, realizando un control del número de partículas existentes en el ambiente de trabajo de la sala blanca.

El objetivo del presente trabajo pretende dar a conocer una revisión de la normativa existente en terapias avanzadas, centrándose en el último anexo I de las NCF, donde se hace especial mención al control de partículas en el aire de una sala blanca destinada a la producción de medicamentos de terapias avanzadas. Se definen los puntos de monitorización mínimos requeridos para dar por validado un proceso de producción.

TERAPIAS AVANZADAS

Los medicamentos de terapia avanzada son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces. Enfermedades como el cáncer, diabetes, isquemia crítica crónica, infarto de miocardio, parkinson, etc... Están siendo diana de estudio, en búsqueda de una alternativa a al mejora de la salud de estos pacientes.

Actualmente la mayoría de las producciones medicinales de terapias avanzadas están encaminadas a la producción de células humanas, enmarcándose en un ámbito no de comercialización si no de I+D+I. Los primeros pasos en el desarrollo de terapias avanzadas se enmarcan en la investigación básica y preclínica, sobre estudios de toxicidad y evaluación de la actividad biológica. En la traslación de la investigación básica a la clínica, concurren varios factores: normas de producción, instalaciones, personal y proceso. Actualmente los ensayos clínicos que se están llevando a cabo analizan la seguridad del producto, Fase I-II, para posteriormente concluir con la Fase III de eficacia, y posterior comercialización, Fase IV. El propietario de una autorización para comercializar productos medicinales de terapia avanzada deberá garantizar un sistema que asegure que cada producto y sus componentes puedan ser examinados durante el proceso de obtención, fabricación, empaquetado, almacenado, transporte y entrega.

Sea cual fuere el fin, ensayo clínico o comercialización, la producción de estos medicamentos debe realizarse en un marco legislativo donde las células, genes y tejidos son considerados medicamentos. Por lo que se requieren laboratorios específicos de producción de medicamentos de terapia celular. La Guía de Normas de Correcta Fabricación (NCF) de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario Anexo I, Fabricación de medicamentos estériles, de entrada en vigor en marzo del 2009, define que la fabricación de productos estériles está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos, describiendo que la producción de un medicamento de terapias avanzadas. Deben realizarse en laboratorios específicos, donde la calidad del aire este controlado, mediante una monitorización de partículas, ya sea en número o en calidad microbiológica.

SALA BLANCA

La fabricación de productos estériles (terapias avanzadas) debe llevarse a cabo en zonas limpias. El acceso a estas zonas debe realizarse a través de exclusas reservadas para el personal y/o los equipos y materiales filtrados a través de filtros de eficacia pertinente. Las zonas limpias deben mantener un nivel de limpieza adecuado y han de estar dotadas de un exhaustivo control de la calidad del aire.

Un laboratorio de producción celular debe cumplir los requisitos mínimos para que el producto a fabricar sea aséptico. Estas instalaciones se denominan salas blancas, salas GMP o salas limpias. Deben considerarse varios aspectos, a saber:

- la protección del producto

- la protección del personal
- la protección del medio ambiente.

Una sala blanca es una sala especialmente diseñadas para obtener bajos niveles de contaminación. Estas salas tiene que tener los parámetro ambientales estrictamente controlados: partículas en aire, temperatura, humedad, flujo de aire, presión interior del aire, iluminación. En todos los sistemas de acondicionamiento de aire, el sistema de filtración a seleccionar, debe prever la retención apropiada de las partículas procedentes del exterior. El riesgo de contaminación cruzada debe ser necesariamente evaluado para diseñar correctamente la sala blanca.

Se suele identificar como sala blanca a aquella en la que los parámetros enumerados a continuación se mantienen alrededor de los valores de consigna con tolerancias muy estrechas sean cuales sean las condiciones exteriores y el proceso de producción que se realice en su interior:

- Número y dimensiones de partículas en el aire.
- Temperatura seca y distribución de la misma.
- Temperatura húmeda y distribución de la misma.
- Flujo de aire: velocidad y dirección, así como su distribución en la sala.
- Presión interior del aire y su distribución.
- Geometría y acabados interiores.
- Iluminación.
- Protección contra incendios.
- Protección electrostática.

Las salas blancas se clasifican por el grado de pureza del aire interior o por el flujo del aire.

▪ *Por el grado de pureza del aire interior:*

Las salas blancas se clasifican en función de la limpieza de su aire. La Organización Internacional de Normalización (ISO) ha publicado varias normas al respecto, redactadas por diversos comités de expertos, designados por los Estados en todo el mundo.

▪ *Por el flujo del aire:*

Por el tipo de flujo, las salas blancas se agrupan en flujo multidireccional y unidireccional. En el primero el régimen de movimiento del aire es turbulento mientras que en el segundo es laminar.

Un parámetro importante que tiene su influencia en la clase de limpieza del aire y, consecuentemente, en la calidad del producto farmacéutico, es el control de la presión estática en la sala. Se debe definir un gradiente de presiones en escala ascendente o descendente, según se defina el proceso a realizar. En el caso de la fabricación de productos estériles, con el fin de prevenir una posible contaminación, la cadena de presiones de cada uno de los compartimentos será de menor a mayor en intervalos de 10-15 pascuales positivos. Si por le contrario el producto a procesar es vírico y la prevención es que no salga contaminación el juego de presiones deberá ser a la inversa, negativas y en forma ascendente.

Según las NCF o GMP (Good Manufactures Production) Las salas blancas para la fabricación de productos estériles se clasifican en diferentes entornos según las características requeridas del aire. Cada operación de fabricación exige un grado adecuado de limpieza del entorno en estado de funcionamiento para minimizar los riesgos de contaminación microbiana o de partículas en el producto o los materiales que se estén manipulando. A fin de cumplir las condiciones “en funcionamiento”, estas zonas deben diseñarse de forma que alcancen ciertos niveles especificados de limpieza del aire cuando estén “en reposo”. La situación “en reposo” es aquella en que la instalación está completa con el equipo de producción instalado y en funcionamiento pero sin que esté presente el personal. La situación “en funcionamiento” es aquella en que la instalación está funcionando de la forma definida de trabajo con el número de personas definidas trabajando. Los estados “en funcionamiento” y “en reposo” deben estar definidos en cada sala limpia o zona de salas limpias. Para la fabricación de medicamentos estériles se distinguen cuatro grados:

- Grado A: zona local donde se realizan operaciones específicas de alto riesgo tales como la zona de llenado, de bandejas de tapones, de ampollas y viales abiertos y de realización de conexiones asépticas
- Grado B: entorno para la zona de grado A en el caso de preparación y llenado asépticos.
- Grados C y D: zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de productos estériles.

Para alcanzar los grados de aire A, B, C y D, el número de renovaciones de aire debe estar relacionado con la dimensión de la sala y los equipos y personal presentes en ella; el sistema de aire debe tener filtros apropiados como los HEPA para los grados A, B y C. El filtro HEPA no se menciona para el grado D.

Las normas existentes para instalaciones farmacéuticas se refieren casi exclusivamente al proceso de los formas estériles, en lugar de serlo para el proceso de otros productos no estériles, convirtiéndose en una prescripción importante basada en la experiencia acumulada por los tecnólogos farmacéuticos; los criterios para las formas no estériles fueron válidos hasta que el ISPE (International Society of Pharmaceutical Engineers), con los comentarios de la FDA, desarrolló las líneas a seguir para instalaciones farmacéuticas no estériles, forma de dosificación de productos sólidos de administración oral. Este tipo de líneas a seguir no constituyen una norma, aunque en la primera parte de las mismas se dice que se sugiere encarecidamente seguir los criterios explicados para facilitar así la aprobación de la FDA.

La gran diferencia entre la norma europea y la FDA es que la norma europea hace referencia a los productos estériles, en forma finalmente estéril y aséptica, mientras que la FDA se refiere sólo a la forma aséptica. Además, la norma europea considera las dos posibles condiciones de ocupación, en reposo y en trabajo, a diferencia de la FDA que considera únicamente la condición operacional. A continuación en las Tablas 1-2, se muestra una tabla comparativa entre las GMP's europeas y estadounidenses.

Grado	Parámetro	FDA-GMP 1987 (Rev. 1991)	EEC-GMP edición 1997	
			En reposo	En operación
A (EEC-GMP) AREA CRITICA (FDA-GMP)	Calidad aceptable de las partículas	Cl. 100 a $\geq 0,5 \mu\text{m}$	3.500/m ³ a $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ϕ a $\geq 5,0 \mu\text{m}$	3.500/m ³ a $\geq \phi$ a $\geq 5,0 \mu\text{m}$
	Donde	A un pie (1 ft) del lugar de trabajo aguas arriba del flujo de aire		
	Cuando	Durante las operaciones cerradas llenado		
	Calidad microbiana del aire	4 UFC/m ³	1 UFC/m ³	
	Tipo de flujo	Laminar	Laminar	
	Velocidad del aire	0,45 m/s +/- 20%	0,45 m/s +/- 20%	
	Gradiente de presión	Filtros HEPA (99,97% a 0,3 μm) + 12.5 Pa	Hepa apropiados + 10-15 Pa según las salas de distintos grados	

Tabla 1. Comparativa en grado A, GMP-FDA

Grado	Parámetro	FDA-GMP 1987 (Rev. 1991)	EEC-GMP edición 1997	
			En reposo	En operación
B (EEC-GMP)	Calidad aceptable de las partículas		3.500/m ³ a $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ϕ a $\geq 5,0 \mu\text{m}$	3.500/m ³ a $\geq \phi$ a $\geq 5,0 \mu\text{m}$
	Donde			
	Cuando		Condicion inatendida en un corto periodo de limpieza 15-20 minutos después de terminar las operaciones	
	Calidad microbiana del aire		10 UFC/m ³	
	Tipo de flujo		Para conseguir la clase de limpieza deseada, el número de renovaciones de aire debe relacionarse con el volumen de la sala y los equipos y personal presentes en ella.	
	Velocidad del aire			
	Gradiente de presión		Hepa apropiados + 10-15 Pa según las salas de distintos grados	

Tabla 2. Comparativa en grado B, GMP-FDA

En el dominio internacional, el Comité de la ISO decidió redactar una norma internacional sobre salas limpias, cuya misión era establecer los criterios que debían

regir las salas limpias sin hacer referencia específica a un campo particular (esto quiere decir que son igualmente válidas para la industria farmacéutica). La relación de las normas ISO es la siguiente:

- ISO 14644-1: “*Clasificación of air cleanliness*” (Clasificación de la limpieza del aire). Publicada en mayo de 1999.
- ISO 14644-2: “*Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with - ISO 14644-I*” (Especificaciones de prueba y control para demostrar el continuo cumplimiento de la Norma ISO 14644-I). Versión del proyecto final.
- ISO 14644-3: “*Metrology and test method*” (Metrología y método de prueba). Versión del proyecto del Comité.
- ISO 14644-4: “*Design, construction and start-up*” (Diseño, construcción y puesta en marcha). Versión del borrador final.
- ISO 14644-5: “*Operations*” (Operaciones). Borrador.
- ISO 14644-6: “*Terms and definitions*” (Términos y definiciones). Borrador.
- ISO 14644-7: “*Enhanced clean devices*” (Dispositivos de limpieza). Borrador.

CALIDAD DEL AIRE DE UNA SALA BLANCA

La fabricación de medicamentos estériles está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos. Depende en gran medida de la habilidad, formación y actitud del personal implicado.

A fin de cumplir las condiciones “en funcionamiento”, una sala blanca debe diseñarse de forma que alcance ciertos niveles específicos de limpieza del aire cuando estén “en reposo”.

- La situación “en reposo” es aquella en que la instalación está completa con el equipo de producción instalado y en funcionamiento pero sin que esté presente el personal.
- La situación “en funcionamiento” es aquella en que la instalación está funcionando de la forma definida de trabajo con el número de personas definidas trabajando:

Para la fabricación de productos médicos estériles, existen cuatro grados A, B, C y D. La clasificación de las partículas aerotransportadas de estos grados se define en la siguiente tabla 3.

	Número máximo de partículas de tamaño igual o superior al indicado en la tabla permitido/m ³			
	En reposo		En funcionamiento	
Grado	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Sin definir	Sin definir

Tabla 3. Clasificación de los grados según el número de partículas.

- a) Para alcanzar los grados B, C y D, el número de renovaciones de aire deberá ir en función del tamaño de la sala, así como del equipamiento y el personal presentes en la sala. El sistema de aireación debe estar equipado con filtros apropiados, como los filtro HEPA para los grados A, B y C.
- (b) La directiva relativa al número máximo de partículas autorizado para el estado "de pausa" corresponde aproximadamente a la norma federal 209E (EE.UU.) y a las clasificaciones ISO como sigue: los grados A y B corresponden a las clases 100, M 3.5, ISO 5; el grado C a las clases 10.000, M 5.5, ISO 7 y el grado D a las clases 100.000, M 6.5, ISO 8.
- (c) Las exigencias y límites para esta zona dependerán de la naturaleza de las operaciones realizadas. Las condiciones relativas a las partículas dadas en la tabla para el estado de "pausa" deben obtenerse sin personal tras un corto periodo de limpieza de entre 15 y 20 minutos, (valor indicativo), después de las operaciones. Las condiciones relativas a las partículas del grado A en funcionamiento dadas en la tabla deben mantenerse en el entorno inmediato del producto cada vez que el producto o que el contenedor abierto se exponga al entorno. Se asume que no siempre es posible cumplir las normas relativas a las partículas en el llenado cuando éste está en curso debido a la generación de partículas o de pequeñas gotas a partir del propio producto.

La norma ISO 14644-1 cubre la clasificación de la limpieza del aire en las salas limpias y otros entornos controlados. La clasificación de esta norma se basa exclusivamente en la concentración de partículas en suspensión. Además, las únicas poblaciones de partículas que se tienen en cuenta para la clasificación son las de distribución acumulativa basada en umbrales (límite inferior) de 0,1 μm a 5 μm .

CONDICIONES FISICAS DE UNA SALA BLANCA

La sala se diseña con el fin de alcanzar la temperatura y humedad relativa necesarias para asegurar las condiciones del aire y la comodidad del personal, considerando que éste llevará diferente vestuario según el grado de la sala donde se realice el trabajo. La vestimenta del área estéril se compone de los siguientes elementos:

1. Mono
2. Gorro
3. Mascarilla
4. Calzado área estéril
5. Calzas (para personal visitante)
6. Guantes
7. Gafas
8. Verdugo
9. Polainas

El margen de temperatura mas idóneo para poder realizar las tares en este tipo de salas es 20° a 25°C. Cuando se requieran prendas especiales, incluidas las coberturas de

la cabeza (verdugo) y de los pies (polainas), la temperatura especificada se reduce frecuentemente a un valor entre 18° y 22°C.

El margen de humedad es aceptable entre el 30% y el 55%. Los niveles de baja humedad pueden presentar riesgo de deshidratación del personal. Además, deberán seleccionarse las condiciones termo higrométricas de modo que se tengan en cuenta los requisitos del proceso; este tipo de criterio es especialmente válido para el control de la humedad. El proceso del producto podría requerir las condiciones interiores apropiadas para un proceso en seco, pero esto no puede adecuarse a la comodidad del trabajo, como la baja humedad relativa (25÷30%) para la fabricación de productos higroscópicos. Por otra parte, hay que considerar que en una sala limpia pueden proliferar rápidamente organismos perjudiciales

MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS

Las partículas aerotransportadas pueden tener cualquier forma y estar compuestas por todo tipo de materiales. Además pueden actuar como «transportadores» de bacterias. De ahí que se distinga entre partículas viables y partículas no viables o inertes.

a) EN GRADO A/B

Para clasificar las zonas en grado A debe tomarse en cada punto de muestreo un volumen mínimo de muestra de 1 m³. Para el grado A, la clasificación de partículas del aire es la ISO 4.8 que indica un límite de tamaño de partícula $\geq 5,0 \mu\text{m}$.

Con el fin de clasificar deben usarse contadores de partículas portátiles con tubos de toma de muestra de longitud corta, ya que en los sistemas de muestreo remotos con tubos de larga longitud la velocidad de precipitación de las partículas con un tamaño $\geq 5 \mu\text{m}$ es mayor. Los cabezales isocinéticos de muestreo deben utilizarse en sistemas de flujo de aire unidireccional.

La clasificación “en funcionamiento” puede demostrarse a través de operaciones habituales o simuladas o durante la simulación del peor caso mediante llenado con medios de cultivo. La norma EN/ISO 14644-2 proporciona información sobre las pruebas que pueden realizarse para demostrar cumplimiento continuado con la clasificación del grado de limpieza asignado.

Se debe usar un sistema de medición continua para la monitorización de la concentración de partículas en la zona de grado A, siendo también recomendable para las áreas de grado B circundantes, aunque puede reducirse la frecuencia de muestreo.

La localización de los sistemas de monitorización de partículas (según análisis de riesgos y resultados de clasificación):

- Punto próximo al producto expuesto y a la altura de trabajo;
- Punto de mayor trasiego de personal y/o material (próximo a puertas...)

- Punto del entorno más alejado de la zona de influencia del FL, puntos de menor efectividad del flujo de aire tratado (determinado por test del humo)

Se debe tener en cuenta que el muestreo no pueda comprometer la laminaridad del flujo del aire en la zona crítica y que el aparato de recuento este orientado en la dirección de entrada del flujo del aire.

b) EN GRADO C/D

Deben monitorizarse siempre, lo que puede variar es la frecuencia de monitorización, a lo largo de un proceso de producción celular, diseñándose un plan de monitorización en base a criterios de riesgo:

- Monitorización más frecuente al principio (en instalación nueva);
- Establecer el proceso definiendo tendencias y límites de alerta y acción;
- Cuando el proceso está instaurado: monitorizar a intervalos definidos y justificados.

SISTEMAS DE MONITORIZACIÓN DE PARTÍCULAS Y TOMA DE MUESTRA

Los sistemas de monitorización de partículas del aire pueden consistir en contadores de partículas independientes, una red de puntos de muestreo de acceso secuencial conectada por un colector a un contador simple de partículas o la combinación de ambos. El sistema elegido debe ser adecuado al tamaño de partícula considerado. En el caso de usar sistemas de muestreo remotos debe tenerse en cuenta la longitud y el radio de cualquier curva de los tubos a efectos de pérdida de partículas en los mismos. La selección del sistema de monitorización debe tener en cuenta cualquier riesgo que presenten los materiales usados en la operación de fabricación, por ejemplo aquellos que implican organismos vivos o radiofármacos.

El tamaño de las muestras tomadas en la monitorización utilizando sistemas automáticos serán de forma general una función de la velocidad de muestreo del sistema utilizado. No es necesario que el volumen de la muestra sea el mismo que el utilizado para la clasificación formal de las salas limpias y aparatos de aire limpio.

Una vez se haya seleccionado el equipo deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones previas:

- No mover ninguna tapa del contador de partículas si no es siguiendo los procedimientos indicados en el manual.
- El operario deberá tener especial cuidado a la hora de transportar el aparato, protegiendo especialmente la pantalla.
- Cuando el contador de partículas no se vaya a utilizar durante un periodo largo de tiempo (más de tres meses) la batería debe ser desconectada. Para almacenar el contador es recomendable el uso del maletín de transporte diseñado para ello.

El contador de partículas basa su cálculo en dividir el tiempo transcurrido en segundos, entre el resultado multiplicado por el tiempo total en segundos para adquirir el volumen específico (pies cúbicos o metros cúbicos).

CONCLUSION

Es evidente la importancia que tiene una sala blanca como principal factor a controlar en la producción de un medicamento de terapias avanzadas. Se debe considerar la graduación de los diferentes compartimentos según la criticidad de la actividad a desarrollar, realizando por tanto un conteo de partículas en función de las renovaciones de aire diseñadas. Manteniéndose constantes los parámetros críticos como la presión, caudal, clase de contaminación, temperatura y humedad relativa. El conteo de partículas debe realizarse en continuo y durante los procesos críticos de la producción del medicamento en Grado A/B, según indica las NCF. Debiendo quedar previamente definido por el fabricante cuales serán los puntos críticos, el equipo y el proceso de toma de muestra. Pudiéndose así garantizar el control de la calidad del aire de la sala y la asepsia del medicamento.