

Pietro Motta¹, Francesca Romana Priolisi², Giorgia Bottini³, Francesca Losito³, Alessandra Checcoli¹, Emanuela Silvi¹, Liliana Tirimbelli¹, Giovanni Antonini³

¹Dipartimento Farmaceutico e di Farmacoeconomia Aziendale, AUSL Roma C

²MBS srl, Roma

³Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre

Controllo microbiologico in un laboratorio galenico ospedaliero: confronto tra metodica tradizionale e metodica MBS

Riassunto. **Introduzione.** Nel laboratorio galenico di una farmacia ospedaliera si devono spesso preparare medicinali per uso parenterale, operando all'interno di ambienti sterili e utilizzando procedure di allestimento asettiche. Poiché in genere la preparazione galenica deve essere utilizzata immediatamente, la Farmacopea Ufficiale prevede la possibilità di somministrare le stesse senza aspettare alcuna validazione microbiologica che confermi l'assenza di microrganismi. **Scopo.** Si è proceduto a validare una nuova metodica di analisi microbiologica caratterizzata dall'aver tempi di risposta inferiori a quelli delle procedure tradizionali, maggiore facilità d'uso e minori costi. **Materiali e metodi.** La nuova metodica, denominata Micro Biological Survey (MBS), è stata confrontata con il metodo di analisi microbiologica tradizionale sia per la ricerca di eventuali microrganismi presenti in diverse tipologie di preparazioni galeniche, sia per il monitoraggio ambientale del laboratorio. **Risultati.** Le risposte sono state del tutto sovrapponibili tra la metodica tradizionale e la nuova metodica MBS. **Conclusioni.** Se utilizzato di routine per i preparati galenici parenterali e per il monitoraggio ambientale, il metodo MBS può dare la certezza di avere assenza di microrganismi aerobi in fase vegetativa di origine animale prima della somministrazione al paziente. Inoltre, per la sua esecuzione non necessita di attrezzature complesse e di personale specializzato, a fronte di costi di utilizzo inferiori.

Parole chiave: laboratorio galenico, controllo microbiologico, Micro Biological Survey.

INTRODUZIONE

Attualmente la maggior parte delle preparazioni galeniche effettuate nei laboratori presenti nelle farmacie ospedaliere riguarda l'allestimento di miscele per nutrizione parenterale totale (NPT), di chemioterapici antiblastici, di terapie

Summary. *Microbiological control, in a hospital galenic laboratory: comparison between traditional methods and Micro Biological Survey method.*

Introduction. Medicines for parenteral use are often prepared by the galenic laboratory of a hospital pharmacy. The preparation must be taken within a sterilized environment in order to set up aseptic preparation procedures. Since usually the galenic preparation should be used immediately, the Official Pharmacopoeia provides the possibility to administer the product without waiting for any validation to confirm the absence of microbiological organisms. **Aim.** We proceeded with the validation of a new microbiological analysis method characterized by shorter time responses, handy at use and lower costs than the traditional procedures. **Materials and methods.** This new method, called Micro Biological Survey (MBS) was compared with the traditional microbiological method, both for searching the presence of any microorganisms within the different types of galenic preparations and for the environmental laboratory monitoring. **Results.** The responses were quite comparable between the conventional method and new method MBS. **Conclusions.** If the method is used on a regular basis both for parenteral galenic preparations and for environmental monitoring, the MBS method can guarantee the absence of aerobic microorganisms in vegetative phase of animal origin prior to patient administration. In addition the carrying out of the method does not need complex equipment and skilled personnel, compared to lower usage costs.

Kew words: galenic laboratory, microbiological control, Micro Biological Survey.

antibiotiche, oltre alla preparazione di alcuni prodotti galenici non sterili, le cui monografie sono spesso presenti nel formulario nazionale della Farmacopea Ufficiale Italiana (FUI). Secondo la FUI, le preparazioni parenterali devono soddisfare i requisiti di sterilità¹, mentre i preparati non obbligatoriamente sterili (cps. per uso orale, forme

farmaceutiche per uso topico, ecc.) devono rientrare nei limiti di carica microbica prescritti dalla FUI².

Il saggio di sterilità previsto in farmacopea (terreno fluido al tioglicolato, terreno di idrolizzato di soia e caseina, ecc.) richiede tempi lunghi di esecuzione non compatibili con le brevi stabilità delle preparazioni e con la necessità di somministrare il preparato al paziente in tempi ristretti. Per ovviare a ciò, le Norme di Buona Preparazione (NBP) della FUI hanno previsto deroghe al controllo di sterilità per i preparati da somministrare entro limiti temporali definiti, purché tali prodotti siano preparati con metodi che assicurino la sterilità, in ambienti idonei e corrispondenti a quanto prescritto in FUI³.

Ci si è quindi trovati di fronte all'esigenza di mettere a punto metodi di analisi rapidi, semplici e affidabili, al fine di ottenere risposte immediate per una migliore prevenzione dei rischi microbiologici.

In tale contesto s'inserisce il metodo Micro Biological Survey (MBS), che permette di eseguire analisi microbiologiche in tempi rapidi, garantisce semplicità d'uso all'operatore e un significativo risparmio dei costi. Il metodo MBS è stato sviluppato e brevettato dall'Università Roma Tre e validato secondo la norma UNI-ENV-ISO 13843 (2000)⁴. Si tratta di un sistema colorimetrico rapido, che permette di rilevare e quantificare i microrganismi presenti negli alimenti, nelle acque e sulle superfici di lavoro. Il principio su cui si basa è quello di stabilire una corrispondenza tra la carica microbica presente nel campione e l'attività enzimatica dei microbi stessi.

OBIETTIVI

Vista l'impossibilità di utilizzare i tradizionali saggi di sterilità per convalidare le preparazioni parenterali prodotte in farmacia a causa dei lunghi tempi di risposta, si è provveduto a raffrontare il metodo di analisi MBS, brevettato dall'Università Roma Tre e caratterizzato da tempi rapidi di esecuzione, con la metodica tradizionale, basata su semina in terreno agarizzato.

Tale raffronto è stato eseguito su preparazioni utilizzate per NPT, su capsule per uso orale, su unguenti per uso topico e negli ambienti dei laboratori utilizzati (camera sterile e laboratorio di galenica tradizionale).

La validazione di un metodo microbiologico è tale se:

1. fornisce la prova documentata che il metodo è adatto allo scopo ed è in grado di: rilevare la presenza/assenza (metodo qualitativo); quantificare il numero delle colonie di uno specifico microrganismo o gruppi di microrganismi di una determinata matrice (metodo quantitativo);
2. assicura che il metodo è adatto allo scopo ed è affidabile nella applicazione routinaria di laboratorio.

MATERIALI E METODI

Il Micro Biological Survey

La procedura analitica del metodo colorimetrico quantitativo MBS (prodotto e commercializzato da MBS Srl – Polo Tecnologico Tiburtino) è basata sulla rilevazione colorimetrica, attraverso indicatori redox, del cambiamento dello stato ossidoriduttivo del mezzo di reazione dovuto all'azione degli enzimi del metabolismo primario (ossidoreduttasi coinvolte nella respirazione e fermentazione) posseduti dai microrganismi. Gli indicatori, infatti, possiedono la caratteristica di cambiare colore (fenomeno detto viraggio) quando viene modificato l'ambiente in cui si trovano. Il metodo MBS perciò misura la carica microbica di un campione, rilevando l'attività degli enzimi metabolici batterici, a differenza dei metodi tradizionali che utilizzano la capacità replicativa dei microrganismi (motivo per cui richiedono tempi di risposta più lunghi).

Tale metodo permette di avere risultati quantitativi sul numero di microrganismi eventualmente presenti nel campione analizzato, poiché inversamente correlato con il tempo di viraggio.

Per poter effettuare l'analisi, dopo l'apertura della fiala, occorre inserire il campione da analizzare (1 ml di un campione liquido, circa 1 g di un campione solido o la testa di un tampone) e successivamente aggiungere 10 ml di acqua sterile. La fiala contenente il reattivo e il campione da analizzare viene agitata per permettere il completo dissolvimento del reattivo in polvere, quindi viene posta in un dispositivo di termostatazione, che permette di mantenere la fiala alla temperatura prefissata (in genere, 37 °C). L'operatore dopo un determinato intervallo di tempo deve osservare il colore del contenuto della fiala di reazione e annotare l'eventuale cambiamento di colore. Quindi, tramite la tabella di riferimento preimpostata (tempo occorso per il cambiamento di colore – quantità di microrganismi) viene determinata esattamente la concentrazione batterica, ovvero l'indicazione presenza/assenza. La fiala di reazione è provvista di un tappo perforabile, costituito da un serbatoio tranciatore contenente lo sterilizzante chimico da utilizzare dopo l'analisi per garantire un adeguato smaltimento. La sensibilità del metodo verso i differenti generi microbici è ottenuta utilizzando reattivi specifici, che contengono sostanze inibitorie verso microrganismi diversi da quelli ricercati e già in uso nelle metodiche tradizionali.

Metodica tradizionale

Per valutare la capacità del metodo MBS di rispondere ai requisiti essenziali richiesti per l'adozione di metodi alternativi a quelli tradizionali, e cioè rapidità di esecuzione e di risposta conservando caratteristiche di sensibilità e affidabilità, sono state eseguite in parallelo analisi con le metodiche classiche.

In particolare, sono state condotte in parallelo:

1. l'analisi effettuata tramite fiale MBS per la ricerca della carica batterica totale (CBT) con la metodica di conta su piastra in terreno Tryptic Soy Agar (TSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)⁵.
2. l'analisi effettuata tramite fiale MBS per la ricerca dei coliformi totali con la metodica di conta su piastra in terreno Mac Conkey Agar (MCA; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy)⁶.

L'analisi delle preparazioni galeniche svolta con la metodica di conta su piastra è stata svolta seminando per inclusione 1 ml di soluzione/campione da analizzare su terreno agarizzato TSA per CBT e MCA per coliformi totali. Mentre l'analisi delle superfici nel laboratorio galenico sterile e non sterile, effettuata attraverso la metodica di conta su piastra, è stata svolta utilizzando piastre da contatto identificate con il nome commerciale di RODAC (Replicate Organism Detection And Counting)⁷.

La ricerca della CBT effettuata a 37 °C permette di rilevare microrganismi mesofili aerobi o microaerofili patogeni fornendo un quadro generale dello stato igienico e valuta se le procedure adottate sono corrette. La ricerca dei coliformi totali effettuata a 37 °C è un indicatore di eventuale contaminazione fecale, più ampia che con *E. coli*, a causa della loro tolleranza ad alcune procedure di disinfezione e alla loro notevole stabilità all'ambiente esterno⁸.

Al fine di convalidare il metodo di analisi si è anche proceduto a inquinare artificialmente i campioni con *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25992 (controlli positivi) e successivamente ad analizzarli con entrambe le metodiche.

In particolare, le analisi sono state svolte sui seguenti campioni:

- aree di lavoro in un laboratorio di galenica sterile;
- preparati di galenica sterile, quali miscele per NPT;
- aree di lavoro in un laboratorio di galenica tradizionale;
- preparati di galenica tradizionale, quali unguento per uso cutaneo e capsule per uso orale.

RISULTATI

I controlli effettuati sui preparati sterili sono stati effettuati su 24 sacche per NPT, operando piccoli prelievi. Si è scelto di utilizzare questo tipo di preparazioni perché l'eventuale presenza di farmaci batteriostatici e/o battericidi avrebbe compromesso la ricerca di eventuali microrganismi. Il prelievo, del contenuto di circa 4 ml, è stato effettuato all'interno della camera sterile tramite siringhe luer-lock, utilizzando l'apposita via di prelievo presente nelle sacche in EVA.

Un ml di ogni campione prelevato è stato analizzato tramite fiale MBS per la ricerca della CBT. Si è notato un istantaneo viraggio dell'indicatore non dovuto alla presenza di batteri, bensì alla presenza nella soluzione analizzata di vitamina C che, essendo un potente riducente, ha causato l'immediato viraggio dell'indicatore presente nel reattivo MBS. È stato sufficiente agitare le fiale e aspettare circa 20 min affinché l'ossigeno presente nell'aria ossidasse il contenuto e ristabilisse il colore iniziale.

Stessa procedura è stata eseguita con le fiale MBS per la ricerca dei coliformi totali. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C per la ricerca di CBT e coliformi totali non è stata visualizzata alcuna variazione di colore in nessuna delle fiale MBS, indice di assenza di batteri aerobi in fase vegetativa (Tabella 1).

Parallelemente, i campioni prelevati sono stati analizzati con la metodica tradizionale, tramite semina per inclusione su piastra in terreno Tryptic Soy Agar (per la ricerca della CBT) e Mac Conkey Agar (per la ricerca dei coliformi totali), ottenendo risultati negativi (Tabella 1).

Al fine di validare il nuovo metodo di ricerca, si è proceduto a ripetere l'analisi con otto campioni inquinati artificialmente (tramite *E. coli*). In questo caso si sono ottenuti risultati positivi, con viraggio di colore, in entrambe le fiale MBS per

Tabella 1. Risultati ottenuti effettuando controlli microbiologici su preparazioni galeniche con il metodo MBS e il metodo di riferimento di conta su piastra.

Risultati controlli microbiologici su preparazioni galeniche				
Campione analizzato	Risultato MBS per CBT	Risultato MBS per Coliformi	Risultato piastra per CBT	Risultato piastra per Coliformi
Sacche per NPT (tot. 24 campioni)	-	-	-	-
Sacche per NPT inquinate artificialmente (tot. 8 campioni)	+	+	+	+
Capsule uso orale (tot. 8 campioni)	-	-	-	-
Capsule uso orale inquinate artificialmente (tot. 8 campioni)	+	+	+	+
Unguento uso topico (tot. 8 campioni)	-	-	-	-
Unguento uso topico inquinato artificialmente (tot. 8 campioni)	+	+	+	+

Il risultato negativo, ovvero l'assenza di viraggio per il metodo MBS e l'assenza di colonie su piastra è indicata con il segno "-"; il risultato positivo, ovvero il viraggio per il metodo MBS e la presenza di colonie su piastra sono indicati con il segno "+".

CBT e coliformi totali, in tutti i campioni analizzati, e presenza di colonie in tutte le piastre (Tabella 1). Altri controlli sono stati eseguiti su differenti forme farmaceutiche quali capsule per uso orale e unguento per uso topico che, secondo la FUI, non richiedono necessariamente il requisito di sterilità ma dei limiti di accettazione per la qualità microbiologica. Le capsule, contenenti 500 mg di CaCO_3 , e l'unguento, formato da ZnO e vaselina bianca, sono stati anch'essi analizzati tramite fiale MBS per CBT e per coliformi totali e in parallelo con metodica tradizionale. Gli esami, con entrambe le metodiche, hanno dato *in toto* risultati negativi. Come precedentemente effettuato, si è proceduto anche in questo caso a inquinare artificialmente i campioni e a ripetere le analisi. Anche in questo caso, come era lecito aspettarsi, si è avuta variazione di colore nelle fiale e formazione di colonie nelle piastre (Tabella 1). Per ultimo si è testata la metodica MBS per un eventuale utilizzo per i controlli ambientali effettuati nel laboratorio galenico. Sono state paragonate le due metodiche utilizzando: tamponi a secco strisciati sulla superficie da analizzare e letti con la metodica MBS e piastre RODAC, appoggiate sulla stessa superficie e incubate a 37 °C, prima di procedere alla lettura delle eventuali colonie formatesi (Figura 1). Sono state scelte quattro aree del piano di lavoro all'interno della camera sterile, campionate all'inizio dell'attività lavorativa e al termine, e otto aree nel laboratorio dove vengono allestite le preparazioni galeniche non sterili. I risultati sono stati negativi in tutti i campionamenti effettuati all'interno della camera sterile, mentre si sono avuti risultati positivi nelle seguenti aree dell'altro laboratorio: superficie del piano di lavoro a fine giornata lavorativa, pavimento vicino al bancone,

pavimento vicino al frigo con viraggio delle sole fiale MBS per CBT e formazione di colonie solamente nelle piastre RODAC con terreno TSA; ripiano dello scaffale di stoccaggio con variazione di colore anche nelle fiale MBS per coliformi totali e formazione di colonie anche nelle piastre RODAC con terreno MCA (Tabella 2).

DISCUSSIONE

L'importanza di un efficace controllo microbiologico all'interno di un laboratorio galenico di una farmacia ospedaliera è fondamentale per la salute dei pazienti. In questa ottica si è proceduto a paragonare il sistema analitico rapido MBS alla metodica tradizionale di conta su piastra, al fine di valutare se fosse in grado di offrire garanzie equivalenti a quelle dei metodi tradizionali autorizzati dalla FUI. Il metodo MBS è un metodo colorimetrico, brevettato dall'Università Roma Tre, che permette di eseguire analisi microbiologiche in tempi rapidi e garantisce la semplicità d'uso e un notevole risparmio economico. Il principio analitico su cui si basa è la misurazione dell'attività catalitica di enzimi ossidoreduttasici del metabolismo primario dei batteri, che permette di stabilire una corrispondenza diretta tra l'attività enzimatica rilevata e la carica microbica presente nel campione. Il metodo MBS, perciò, misura la carica microbica di un campione, rilevando l'attività degli enzimi metabolici batterici, a differenza dei metodi tradizionali che utilizzano la capacità replicativa dei microrganismi. Ciò permette, a parità di selettività rispetto alle metodiche tradizionali di riferimento basate sulla replicazione cellulare, una sensibile riduzione dei tempi di analisi.

Figura 1. Confronto analisi di superficie effettuata con il metodo MBS e con il metodo della conta su piastre a contatto RODAC.



Tabella 2. Risultati ottenuti effettuando controlli microbiologici su superfici del laboratorio galenico con il metodo MBS e il metodo di riferimento di conta su piastra.

Risultati controlli microbiologici nel laboratorio galenico					
	Campione analizzato	Risultato MBS per CBT	Risultato MBS per coliformi	Risultato piastra per CBT	Risultato piastra per coliformi
Aree del piano di lavoro all'interno del laboratorio galenico sterile	Aree del piano di lavoro all'inizio dell'attività lavorativa (tot. 4 campioni)	-	-	-	-
	Aree del piano di lavoro al termine dell'attività lavorativa (tot. 4 campioni)	+	+	+	+
Aree del piano di lavoro nel laboratorio galenico non sterile	Superficie del piano di lavoro a fine giornata lavorativa	-	-	-	-
	Pavimento vicino al bancone	+	+	+	+
	Pavimento vicino al frigo	-	-	-	-
	Ripiano dello scaffale di stoccaggio	+	+	+	+

Il risultato negativo, ovvero l'assenza di viraggio per il metodo MBS e l'assenza di colonie su piastra è indicata con il segno "-"; il risultato positivo, ovvero il viraggio per il metodo MBS e la presenza di colonie su piastra sono indicati con il segno "+".

L'analisi effettuata tramite fiale MBS è stata paragonata con la metodica di conta su piastra in terreno TSA per la ricerca della CBT e in terreno MCA per la ricerca di coliformi totali^{5,6}. Lo studio è stato effettuato su preparazioni da somministrare per via parenterale, su preparazioni per uso orale e per uso topico. È stato anche sperimentato un suo possibile utilizzo per monitorare le condizioni igieniche ambientali all'interno del laboratorio. In tutti questi raffronti si è visto che le analisi effettuate con il metodo MBS risultano equiparabili a quelle eseguite con il metodo di riferimento di conta su piastra, con il vantaggio di essere semplici, accurate, utilizzabili senza disporre di un laboratorio attrezzato per analisi microbiologiche e personale specializzato e aventi un costo inferiore. Concludendo, le analisi microbiologiche effettuate con il metodo MBS hanno caratteristiche di rapidità (da 3 a 28 ore), sensibilità, selettività, economicità e sono così semplici da effettuarsi che possono essere svolte anche da personale non specializzato e senza la necessità di operare in un laboratorio di microbiologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, XII Edizione, pag. 193.
2. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, XII Edizione, pag. 683.
3. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana, XII Edizione, pag. 1423.
4. NORMA UNI ENV ISO 13843 (2000). Qualità dell'acqua. Guida per la validazione di metodi microbiologici.
5. Mac Faddin JF. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1985.
6. Mac Conkey A. Lactose-fermenting bacteria in faeces. J Hyg 1905; 5: 333-79.
7. INAIL-ConTARP. Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro: campionamento e analisi. 2005.
8. Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT. Microbial indicators of fecal contamination in water: a current perspective. Wate, Air Soil Pollut 2005; 166: 139-66.

Indirizzo dell'Autore:

Dott. Pietro Motta
 Dipartimento Farmaceutico e di Farmacoeconomia Aziendale
 AUSL Roma C
 Via Primo Carnera 1
 00142 Roma
 E-mail: motta.pietro@aslrmc.it