

La rilevazione microbica istantanea

C. Bolotin – BioVigilant (USA)

È stata sviluppata una nuova tecnologia ottica che permette di determinare simultaneamente la quantità e la dimensione delle particelle in un liquido o in aria, ed anche se ciascuna particella sia inerte o biologica; il tutto in tempo reale. La tecnologia, sviluppata dalla BioVigilant, permettendo di effettuare un'analisi microbica istantanea, può diventare molto vantaggiosa per le industrie farmaceutiche. Questo articolo illustra, in maniera succinta, come questa tecnologia funziona, le sue applicazioni e come essa risolve alcuni problemi tipici

Parole chiave: Biocontaminazione – Tecnologia a sensori fluorescenti – Monitoraggio continuo
Applicazione farmaceutica

Panorama odierno e futuro

Per ragioni interne e regolatorie all'interno del mondo farmaceutico, si richiede che si facciano dei campionamenti per determinare il livello di contaminazione microbica. I metodi di analisi convenzionali comunque hanno tutti delle caratteristiche negative in comune:

- il costo delle analisi è alto;
- il processo richiede molto lavoro individuale, e spesso anche messe a punto, monitoraggi e conteggi;
- il processo è episodico e lento, con risultati generalmente disponibili dopo 2-5 giorni.

Tra questi aspetti indesiderabili, le conseguenze più significative sono quelle riguardanti i tempi di attesa per i risultati, incluse le costose soste (pianificate o meno) nella produzione nonché la produzione fatta nella errata convinzione di operare in condizioni accettabili con la conseguente scoperta che in realtà le condizioni non rispettavano i requisiti interni o internazionali. Questo può comportare il ritiro del prodotto come pure l'inizio di indagini costose e dispendiose.

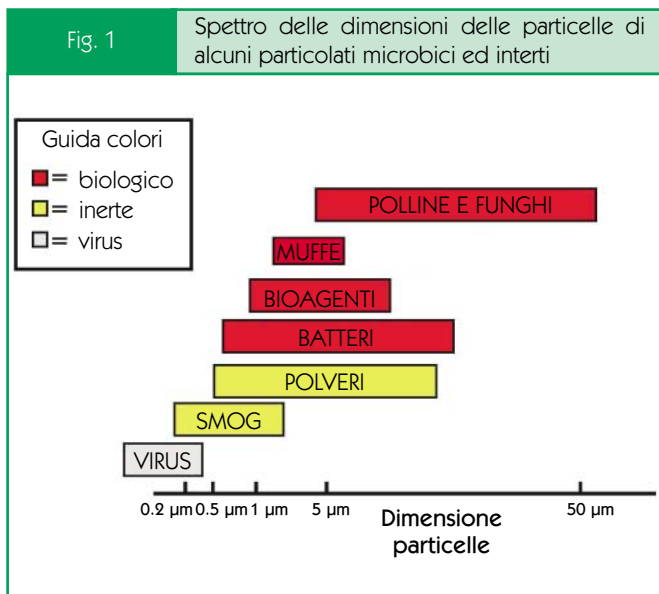
La tecnologia

Originariamente, la tecnologia era stata sviluppata per venire incontro alle richieste dell'esercito americano per la

determinazione in tempo reale di agenti biocontaminanti aeroportati (per esempio il *Bacillus anthracis*) con dimensioni tra 1 e 7 micron.

Dopo aver considerato i requisiti tecnici e aver analizzato la capacità della tecnologia esistente per l'analisi e la misurazione delle particelle (per lo più inventata 20 anni fa) si decise che i metodi esistenti avevano dei grossi limiti, limiti che avrebbero impedito alle società di raggiungere i propri obiettivi. Venne pertanto richiesto un nuovo approccio con un progetto diverso.

Usando un progetto ottico innovativo, fu ideato un metodo in grado di contare e misurare particelle molto piccole a un livello estremamente preciso e a costi molto bassi, aspetti poco realizzabili usando la tecnologia allora esistente. Come ulteriore vantaggio, questa nuova tecnologia garantisce una determinazione simultanea per ciascuna particella individuale, identificandola come inerte o biologica. In aggiunta alla sua applicazione all'interno della sicurezza nazionale, questa nuova tecnologia ha iniziato ad essere utilizzata anche nel campo della produzione farmaceutica. Quanto segue è una breve descrizione della tecnologia a sensori fluorescenti sviluppata per il monitoraggio aeroportato (il monitoraggio liquido è molto simile), usando un rilevatore IMD-A (il modello IMD-A è l'acronimo di Instantaneous Microbial Detector – Air. È stato progettato



anche un prodotto simile chiamato IMD-L, dove L significa “liquido”).

Il rilevatore IMD-A è composto da tre elementi:

1. un assemblaggio ottico per misurare la dimensione della singola particella;
2. un assemblaggio ottico a lettura simultanea per rilevare un segnale fluorescente indotto dal laser UV in alcuni metaboliti presenti nelle cellule microbiche e nelle spore;
3. un algoritmo per la differenziazione dei microbi aeroportati dalle particelle inerti di polvere.

L’assemblaggio ottico usa lo schema ben conosciuto e spesso usato della diffusione di Mie [La diffusione di Mie è un fenomeno ottico in cui un fascio di luce è diffusa da particelle le cui dimensioni sono comparabili alla lunghezza d’onda della luce. In questo caso, l’intensità della luce dispersa dipende dalla dimensione della particella. Usando questo principio, si possono determinare le dimensioni delle particelle misurando l’intensità della luce dispersa da esse], ma applicandolo in maniera innovativa, rendendo quindi lo strumento in grado di realizzare misurazioni molto accurate di particelle aeroportate con dimensioni variabili dai 0.5 micron ai 20 micron. Questa capacità di effettuare distinzioni fini nella dimensione è importante per determinare la classe dei microrganismi, poiché classi di microrganismi differenti hanno differenti varietà di misure, come mostrato nella Figura 1.

L’uso della tecnologia della diffusione di Mie facilita anche l’uso di illuminazione UV, per esaminare in maniera simultanea in ciascuna particella la presenza dei metaboliti NADH e di riboflavina (vitamina B2), intermedi necessari per il metabolismo degli esseri viventi, e quindi esistenti in microrganismi come i batteri e i funghi. Se questi composti chimici esistono come bio-aerosol di particelle viventi aeroportate, sono attivati dall’energia fotonica UV e di conseguenza emettono una luce auto-fluorescente che è rilevata dall’IMD-A. Sebbene la tecnologia non sia in grado di identificare il genere o la specie dei microbi, e i virus siano troppo piccoli e non abbiamo, se liberi, il metabolismo

necessario per essere rilevati, la capacità di determinare simultaneamente, e per ciascuna particella, la sua dimensione e se la stessa è biologica o inerte, indica all’utente la presenza o l’assenza di contaminazione microbica.

Applicazione della tecnologia al campo farmaceutico

Le apparecchiature IMD-A e IMD-L possono essere usate negli ambienti farmaceutici a contaminazione controllata farmaceutici come:

- meccanismo di allarme
- come monitoraggio continuo e dispositivo di andamento
- per verificare se le eventuali azioni correttive hanno avuto successo.

Meccanismo di allarme

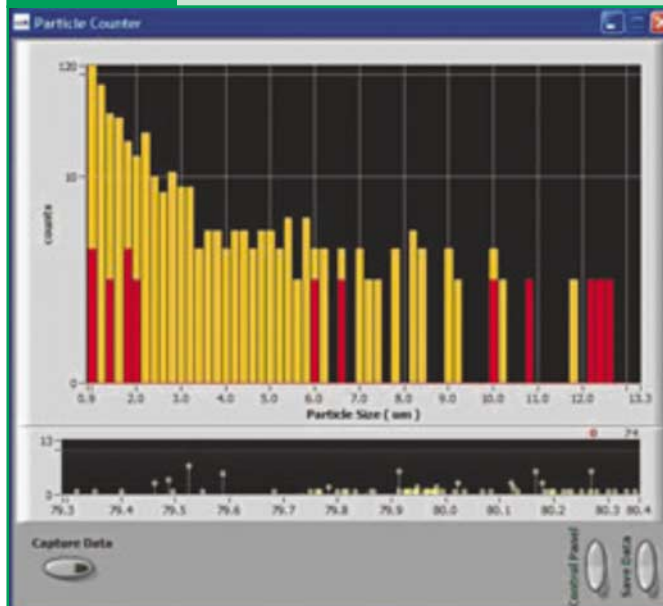
L’IMD-A può campionare l’aria in maniera continua o fare dei controlli a macchia e dare un’indicazione o un allarme quando si rilevano i microbi. Le Figure 2 e 3 sono dei tipici visualizzatori di dati. La Figura 2 mostra un campione di aria pulita senza microbi, mentre la Figura 3 mostra il display quando nell’aria sono presenti muffe in polvere (*saccharomyces cerevisiae*).

In questi esempi, si mostrano gli istogrammi della distribuzione di particelle aeroportate, dove sull’asse delle x vengono rappresentate le dimensioni delle particelle mentre sull’asse delle y sono indicate le conte particellari per litro di aria. Le barre gialle in entrambi i display denotano le particelle inerti, mentre le barre rosse nella Figura 3 denotano la presenza, la dimensione e la conta dei microbi. In caso di rilevazione microbica, gli operatori possono essere avvisati facilmente da un protocollo di allarme, secondo i requisiti specifici della clean room.



Fig. 3

Rappresentazione grafica di aria contaminata da lieviti in polvere



Monitoraggio continuo e dispositivo di andamento

L'abilità dell'IMD a fornire un'analisi microbica istantanea permette di ottenere un monitoraggio continuo ed una situazione dell'andamento, che è particolarmente utile se non è possibile usare i metodi convenzionali esistenti. In più, aiutando ad essere in regola con i requisiti regolatori e interni, questo aspetto della tecnologia rende i suoi apparecchi adatti per implementare la PAT (Process Analytical Technology) fornendo un analizzatore di processo per il monitoraggio microbiologico dell'aria e dei liquidi in clean room. In un reparto produttivo asettico, è vantaggioso poter osservare l'andamento dei modelli relativi alla distribuzione microbica e del particolato in modo che si possa rilevare un'incursione microbica e si possa di conseguenza iniziare un'azione correttiva nel più breve tempo possibile. Gli IMD sono in grado di ottenere l'andamento dall'analisi di un flusso continuo di dati, individuando così le anomalie.

Come esempio di questa applicazione, la Figura 4 mostra un istogramma di un monitoraggio in continuo di un modello di particolato aeroportato su un periodo di 24 ore. La distribuzione del particolato indicata per tempo permette di fare le seguenti osservazioni:

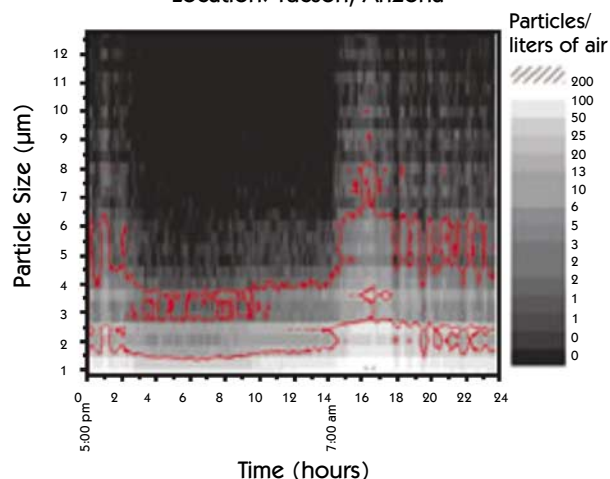
- i dati indicano una chiara variazione diurna
- la distribuzione particellare è influenzata dalle attività umane come evidenziato dalla diminuzione di concentrazione particellare dopo le 17.30 e dal suo aumento a partire dalle 7.15
- le interferenze meccaniche sono una causa del cambiamento di concentrazione particellare, come mostrato da un cambiamento periodico diurna di conta particellare (circa ogni 45 minuti) che corrisponde all'accensione e spegnimento periodico del sistema di ventilazione aria.

Il modello di andamento rivelato nella Figura 4 porta a diverse utili applicazioni per la produzione farmaceutica: a)

Fig. 4

Rappresentazione di una distribuzione particellare in un ambiente chiuso dopo 24 ore; la concentrazione particellare (quantità di particelle/litro di aria) è rappresentata nella scala grigia. Le linee rosse mostrano il livello di concentrazioni uguali di particelle

Room air particulate data taken April 14-15, 2005
Location: Tucson, Arizona



qualsiasi deviazione dalla distribuzione normale in un ambiente controllato segnalerà un reale (o imminente) errore nel sistema di contenimento o di filtrazione; b) gli IMD-A posizionati in maniera strategica potranno fornire una mappa bi-dimensionale della distribuzione microbica o particellare per localizzare con precisione una contaminazione; c) gli IMD-A possono essere usati come "sentinelle" nelle aree sensibili o di passaggio per segnalare la presenza di personale non sanizzato correttamente; e d) gli IMD-A possono essere usati per scoprire deviazioni dalle procedure operative standard da parte degli operatori.

In aggiunta, la tecnologia usata dagli IMD non distrugge i campioni. Ne consegue che:

- possono essere considerati i campioni in corso, rendendo possibile il campionamento in continuo dell'intero lotto, quindi, ciò rende possibile (nel caso in cui ci sia contaminazione) dover scartare soltanto un lotto più piccolo della produzione;
- a certi punti del processo produttivo (come il riempimento delle fiale), il campionamento in continuo dell'intero lotto è una possibilità, quindi rendendo possibile (nel caso in cui ci sia contaminazione) che un lotto più piccolo della produzione dovrà essere sicuramente scartato.

Verificare se le eventuali azioni correttive hanno avuto esiti positivi

In ultimo, gli IMD possono essere usati per ottenere risultati immediati, per esempio, dopo che è stata attuata un'azione correttiva, per determinare, in tempi reali, se l'azione ha avuto esito positivo.

Tabella 1 Comparazione tra metodo IMD e metodo corrente

| Caratteristiche | Metodo IMD | Metodo del conteggio delle piastre | Conseguenze |
|---|--|---|---|
| Tempo previsto per ottenere i risultati | Istantaneo | Fino a 5 giorni | Usando il metodo convenzionale si creano più fermi (programmati o non) nella produzione e si aumenta la possibilità di contaminazione, con conseguente crescita di costi e riduzione della produzione |
| Livello di rilevazione | Rilevamento e dimensionamento dei microbi vitali. Nessuna identificazione per tipi microbici o virus | Rilevamento microbico e identificazione | Quando si usa l'IMD, per quelle applicazioni che richiedono la specificazione, il metodo della cultura potrebbe essere fatto dopo che l'IMD ha rilevato una contaminazione |
| Modo di analisi | Monitoraggio continuo e risultati in tempo reale | Monitoraggio sporadico e risultati ritardati | Il monitoraggio continuo aumenta l'accuratezza, permette di dirigersi verso i singoli problemi |
| Tempo per preparare campione | Nessuno. Basta accendere lo strumento | Può essere significativo | Il metodo convenzionale richiede costi di lavoro elevati e ritardi |
| Intervento umano | Minimo | Richiesto per preparare il campione, trasportarlo e per leggere i risultati | L'intervento umano aumenta il rischio di imprecisioni |
| Costo per analisi | Limitato alla manutenzione del dispositivo e bassi costi per gli accessori usa e getta | Può essere significativo | Il metodo IMD abbassa il costo di analisi |

Comparazione tra il metodo corrente e quello innovativo

In Tabella 1 sono comparati il Metodo di Rilevamento Istantaneo (IMD) e il metodo del conteggio delle piastre.

Conclusioni

Gli IMD-A e IMD-L forniscono un'analisi microbica istantanea e in continuo, diventando molto appetibili per le industrie farmaceutiche. Infatti sono utili per implementare la PAT, per adeguarsi ai requisiti regolatori ed interni in tema di azioni correttive e di monitoraggio microbico; per ridurre

in maniera significativa i fermi di produzione e la contaminazione del prodotto.

Summary An optical technology has been developed that can determine the quantity and size of particles in liquid or air, and simultaneously determine whether each particle is inert or biologic, all in real time. The technology, developed by BioVigilant, provides instantaneous microbial detection, thereby creating wide-ranging and profound positive consequences for pharmaceutical manufacturers. This article briefly discusses the problems this technology solves, how the technology works, and how it is applied

Per ulteriori informazioni segnare sull'apposito tagliando il n. 4