

L'applicazione della citometria a flusso per il monitoraggio microbiologico di acque di grado farmaceutico

F. Thiele (BWT AQUA AG) – L. Grasso (bNovate Technologies)

Parole chiave: Acqua ultrapura – Citometria a flusso – Monitoraggio microbiologico

Nella produzione farmaceutica una particolare attenzione deve essere data all'acqua ultrapura, visto che è considerata come una delle materie prime maggiormente usate e soprattutto può venire a contatto sia con i sistemi di produzione che con il prodotto finale. Nuove tecniche quali la generazione di WFI a freddo o la Rapid Microbial Monitoring permettono di prevenire eventuali rischi in fase di produzione, distribuzione e monitoraggio di qualità delle acque farmaceutiche

Introduzione

L'acqua ultrapura è tra le materie prime più consumate nella maggior parte degli impianti di produzione farmaceutica. In molteplici aspetti della produzione farmaceutica entra in contatto con i sistemi di produzione e con il prodotto finale, quindi gli impianti di trattamento delle acque devono essere progettati, installati e mantenuti come parte di un concetto generale di fabbrica basato sul controllo del rischio. Produttori e fornitori devono lavorare in squadra per ottenere una perfetta integrazione e la massima riduzione dei rischi.

La maggior parte dei potenziali requisiti sono già coperti nei progetti tecnici e nella gestione di apparecchiature e sistemi attuali che seguono le raccomandazioni e le guide di organizzazioni e associazioni come FDA, ISPE, ASME così come le linee guida interne dei produttori.

La bozza dell'allegato 1 delle GMP è in fase di revisione e potrebbe ancora cambiare quindi è prudente attendere prima di apportare modifiche, soprattutto per quanto riguarda le qualità delle acque PW, WFI e dei relativi impianti di produzione, stoccaggio e distribuzione nello stabilimento farmaceutico, nutraceutico, cosmetico e perché no ospedaliero [1].

L'inclusione di nuove tecniche come la generazione di WFI a freddo o la Rapid Microbial Monitoring aprono le porte al loro utilizzo sempre sulla base della corrispondente analisi dei rischi applicata alla produzione, distribuzione e monitoraggio di qualità delle acque farmaceutiche.

In sintesi, i punti chiave raccolti dalle clausole nuove e modificate che interessano PW, WFI e Pure Steam possono essere riassunte come segue:

- Elaborazione della URS e verifica della funzionalità secondo ciclo documentale validato
- Aspettativa di analisi del rischio per apparecchiature e sistemi di produzione sulla base di parametri critici regolarmente monitorati
- Documentazione dettagliata e aggiornata dei sistemi
- Progettazione e gestione delle apparecchiature per la prevenzione dei rischi di contaminazione microbiologica
- Definizione delle qualità dell'acqua di alimentazione per WFI e Pure Steam
- Descrizione dei possibili metodi di produzione WFI, distillazione e produzione di membrane, nonché requisiti di progettazione

(corretta pendenza del piping di distribuzione, regime turbolento nello scorrimento del fluido, regola "3 Diametri" per garanzia di opportuno coefficiente di turbolenza, etc.)

- Aspettativa di un processo di PQ che includa tutti i parametri inclusi nelle farmacopee nelle fasi da 1 a 3 e della durata di 52 settimane per verificare il potenziale impatto stagionale
- Aspettativa di una chiara definizione della gestione del biofilm, dei processi di disinfezione e sterilizzazione e della loro efficacia
- Aspettativa di una strategia basata sull'analisi dei rischi e un programma di monitoraggio chimico e microbiologico con allarmi e limiti di azione
- Aspettativa di monitoraggio continuo di TOC, conducibilità e possibile utilizzo di RMM
- Monitoraggio della qualità del Pure Steam utilizzato per carichi porosi e processi Steam In Place
- Monitoraggio dei parametri Pure Steam non inclusi nella monografia

Il paragrafo 10.11 riporta una indicazione di estrema importanza: *"The use of rapid microbial methods can also be considered. These methods should be validated for the product(s) or processes concerned and be approved in the registered product testing specification"*, stabilendo chiaramente la possibilità di utilizzare le tecnologie RMM.

L'analisi online della carica batterica dell'acqua in quanto eccipiente principale per l'industria farmaceutica, è buona pratica e aspetto critico per la sicurezza dei pazienti e della qualità dei prodotti farmaceutici (ISPE 2011) [2]. Le Unità Formanti Colonia (CFU) sono definite nelle farmacopee come unità di valutazione della qualità microbiologica. Vengono quantificate utilizzando il tradizionale metodo Heterotrophic Plate Count (HPC), un processo che richiede alcuni giorni per l'ottenimento del risultato finale con chiari limiti per i tempi di produzione. I metodi microbiologici rapidi (RMM) valutano la qualità microbiologica più rapidamente e in alcuni casi in modo continuo con chiari vantaggi qualitativi sul prodotto finito. Anche se i metodi microbiologici rapidi sono in uso da più di tre decenni in altri campi, nel settore farmaceutico si sta assistendo ad una applicazione sempre più efficace. E le aziende stanno sfruttando il valore aggiunto del controllo in continuo della contaminazione [3]. Da diversi anni sul mercato farmaceutico sono presenti strumentazioni che rientrano nella classificazione "Online Water Bioburden Analyzers" (OWBA). L'interesse crescente ha ispirato anche la creazione del "gruppo di lavoro OWBA" (OWBA 2013) [4]. Documenti guida, inclusa la più recente revisione dell'Annex 1 delle GMP, come accennato sopra, hanno chiaramente indicato di supportare l'implementazione dei metodi alternativi, con particolare riguardo alle tecnologie RMM, sottolineando come le varie tecnologie impiegate "dovrebbero essere considerate per aumentare la protezione del prodotto dalla contaminazione microbica" (EU-GMP 2020).

La citometria a flusso online automatizzata

Una delle alternative più praticabili ai metodi compendiali tradizionali è la citometria a flusso. Impiegata in maniera sistematica per la prima volta alla fine degli anni '90 (inizialmente utilizzata per analizzare le cellule di mammifero) la citometria a flusso ha ampie applicazioni per la medicina, in particolare nel contesto dell'analisi immunologica [5]. Con l'avanzare della tecnologia e la disponibilità di nuovi reagenti di rilevazione di proprietà batteriche specifiche [6], questa tecnica è stata applicata a numerosi processi microbiologici industriali [7]. In particolare, è stata introdotta nell'industria dell'acqua potabile un decennio fa e si sta affermando come strumento microbiologico standard per enumerare i batteri, per monitorare i processi di trattamento come la disinfezione o l'ultrafiltrazione e per valutare la qualità microbiologica generale di materie prime e acqua trattata [8]. Poiché è già chiaramente citata nell'elenco descrittivo dei nuovi metodi microbiologici applicabili in ambito farmaceutico (test quantitativo per la misura diretta) nella Farmacopea Europea (Ph. Eur. 5.1.6), la citometria a flusso è un serio contendente nel campo del monitoraggio continuo dell'acqua farmaceutica, sia in termini di accuratezza che di celerità nell'ottenimento del risultato. Il principio funzionale della misurazione tramite citometria a flusso è la singola rilevazione e quantificazione delle particelle sospese presenti in un campione di acqua, attraverso la colorazione delle cellule con reagenti fluorescenti per distinguerle dalle particelle inorganiche. Il campione di acqua viene illuminato con luce LASER in un capillare e focalizzato in una area ristretta per ottenere un'ampia precisione. I rivelatori ottici registrano la diffusione della luce e la fluorescenza emessa. Questo rivela informazioni multiparametriche, che vanno dalla concentrazione cellulare alla vitalità delle cellule rilevate.

Il sistema Aqu@Sense MB

Sviluppato in collaborazione con bNovate Technologies, BWT Aqu@Sense MB è un citofluorimetro a flusso completamente automatizzato destinato all'analisi della carica batterica online e a batch di acqua di grado farmaceutico (vedi Figura 1). L'unità microfluidica integrata di preparazione del campione automatizza completamente sia il campionamento dell'acqua che la colorazione attraverso un processo in continuo. I reagenti, sufficienti per un massimo di 1.000 rilevazioni, sono confezionati in una cartuccia ermeticamente sigillata e riciclabile sostituibile senza manipolazione chimica. Con l'intervallo di misurazione selezionato da 30 minuti a 6 ore, lo strumento può funzionare in modo autonomo per diversi mesi.



Figura 1 - AQU@Sense MB

Può quantificare rapidamente e direttamente la conta delle cellule intatte (IC) che vengono enumerate utilizzando una tecnica di doppia colorazione già stabilita. La procedura utilizza i coloranti fluorescenti di DNA SYBR Green I (SGI) e ioduro di propidio (PI) [9]. La valutazione dell'integrità della membrana batterica si ottiene dalle diverse proprietà di penetrazione dei due coloranti. Mentre le molecole SGI idrofobiche possono attraversare liberamente le membrane batteriche, il PI non permea la membrana ma può entrare nella cellula solo se la membrana è compromessa e distinguere tra

batteri vitali o morti (i primi si colorano di verde mentre i secondi di rosso) (vedi Figura 2). Pertanto, l'integrità della membrana è un criterio significativo di vitalità batterica. Questo metodo ha l'ulteriore vantaggio di rilevare tutti i batteri vitali presenti in un campione, comprese le cosiddette cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) [10].

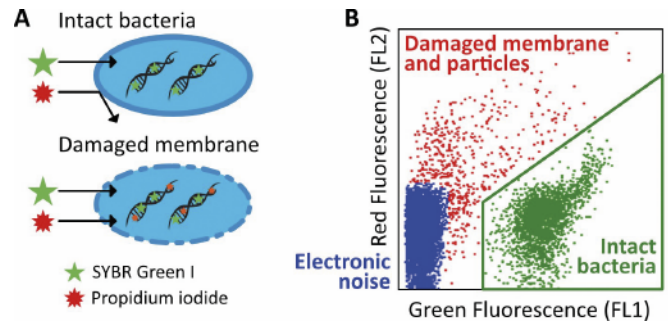


Figura 2 - (A) L'enumerazione ICC si basa sulla valutazione dell'integrità della membrana batterica con colorazioni di DNA SGI (fluorescenza verde) e PI (fluorescenza rossa). SGI colora tutti i batteri contenenti acido nucleico, mentre il PI permeabile può attraversare solo membrane danneggiate. (B) Risultati tipici della misurazione della citometria a flusso: ogni punto rappresenta una particella rilevata dal citofluorimetro a flusso. I batteri intatti sono rappresentati in verde, i batteri danneggiati e le particelle inorganiche sono in rosso.

Dati tipici dell'Aqu@Sense MB

Secondo i documenti guida come le farmacopee e il PDA TR-33, i metodi microbiologici alternativi devono essere in grado di rilevare un ampio spettro di batteri farmaceutici critici (USP <1223>; Ph. Eur. 5.1.6; PDA TR-33). Le tipologie di microrganismi rilevabili dovrebbero includere i ceppi delle collezioni menzionate nei capitoli pertinenti e coprire una varietà di batteri che si trovano comunemente nei sistemi idrici farmaceutici, alcuni dei quali potrebbero non essere rilevabili con i metodi di conteggio mediante piastre standard [11]. Aqu@Sense MB rileva i batteri rilevanti in una sospensione inoculata (vedi Figura 3).

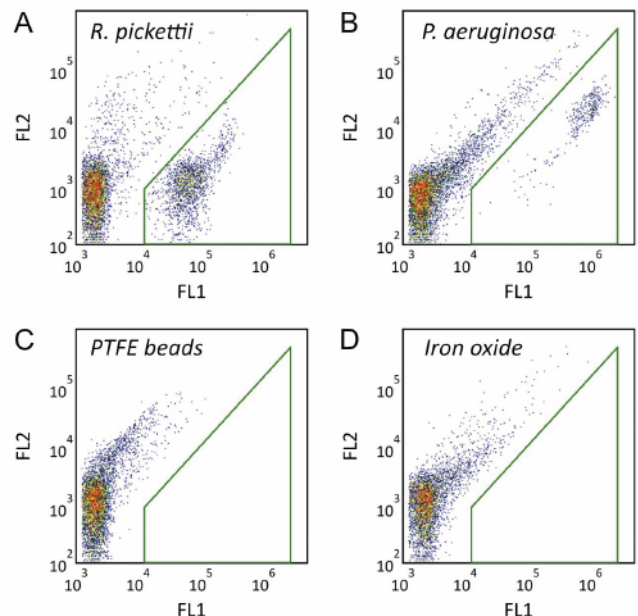


Figura 3 - Esempi di dot plot misurati con Aqu@Sense MB. (A) *Ralstonia pickettii*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) particelle di politetrafluoroetilene (PTFE) da 1 µm in concentrazione di 10 mg/mL in H₂O e (D) particelle Fe₃O₄ da 5 µm in concentrazione di 10 mg/mL in H₂O.

La sfida più grande per l'applicazione OWBA che fa affidamento sulla fluorescenza intrinseca, è la tendenza a identificare erroneamente le particelle come batteri [12]. I falsi positivi sono spesso causati da residui di Teflon® e dalle particelle provenienti dal sistema idrico. Poiché la citometria a flusso utilizza una colorazione specifica del DNA, Aqu@Sense MB può discriminare tra i segnali delle particelle e delle cellule vitali colorate da opportuni reagenti. Inoltre, il processo batch continuo garantisce che le fluttuazioni di temperatura e portata del fluido non influenzino il segnale.

Monitoraggio continuo dell'acqua purificata

Il monitoraggio continuo presenta chiari vantaggi operativi, come dimostrato dai test dei clienti. Riportiamo un esempio per chiarire il concetto. Nel mese di ottobre dello scorso anno, un'azienda farmaceutica ha implementato l'Aqu@Sense MB in un circuito di distribuzione di acqua purificata e ha analizzato la qualità microbiologica dell'acqua continuamente ogni 30 minuti (vedi Figura 4). La linea di base si è mantenuta stabile per una settimana, quando sono stati rilevati valori fino a 4.500 ICC/ml. Poiché il cliente ha eseguito solo il conteggio dei microrganismi con piastre convenzionali su base mensile, non è stato possibile stabilire una correlazione diretta con l'evento. Il controllo di routine eseguito dopo 15 giorni ha rilevato valori insolitamente alti di CFU. Successivamente, la società ha condotto un'indagine interna e ha riscontrato problemi tecnici nel sistema di distribuzione dell'acqua.

Lo strumento è stato in grado di rivelare in tempo reale la situazione di fuori controllo, dando l'evidenza che si stava sviluppando un problema microbiologico nel sistema di distribuzione dell'acqua. Ciò dimostra che se implementato in un loop o in un generatore di PW, può prevenire ulteriori contaminazioni del sistema e del prodotto.

Conclusione

Le autorità per l'industria farmaceutica supportano l'implementazione di RMM per migliorare la sicurezza dei prodotti. La citometria a flusso utilizza un agente colorante specifico per il DNA e quindi evita falsi positivi. BWT Aqu@Sense MB è un sistema di allarme preventivo che consente agli utenti di valutare accuratamente la qualità dell'acqua in qualsiasi momento. È in grado di garantire

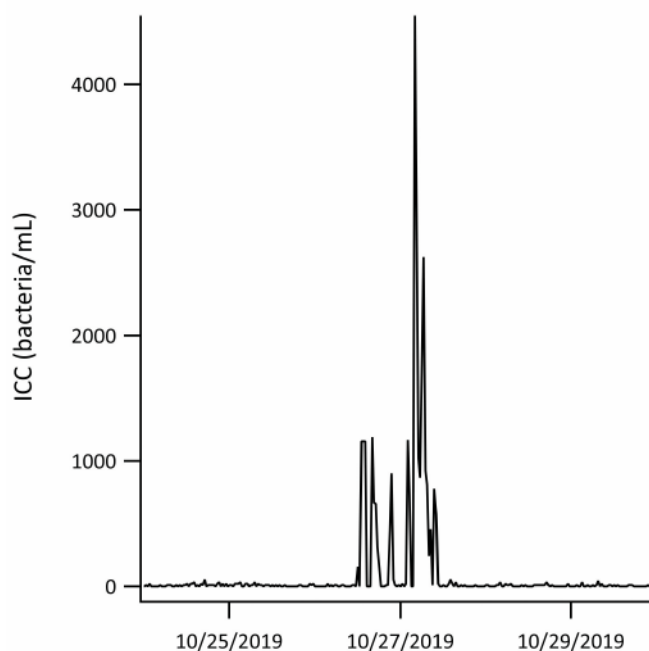


Figura 4 - Monitoraggio continuo del sistema di distribuzione dell'acqua purificata.

un funzionamento dell'impianto più sicuro ed efficiente implementando una corretta conoscenza del processo e tecniche di Process Analytical Technology che forniscono evidenti vantaggi nel controllo in tempi rapidi del bioburden. Aqu@Sense MB può inoltre essere impiegato per utilizzi non compendiali quali: Cleaning Validation, monitoraggio dei punti di erogazione dell'acqua PW/WFI, analisi tecniche di manutenzione predittive, investigazioni e validazione dei processi di biodecontaminazione dei circuiti di distribuzione dell'acqua ultrapura e delle sanitizzazioni di impianti di produzione PW/WFI a freddo.

Per avere ulteriori informazioni sull'articolo inviare una e-mail a redazione@asccanews.it

Bibliografia

- [1] Annex 1 EU-GMP 2020: http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf
- [2] ISEP 2011: ISPE Volume 4 "Water and Steam Systems" 2. edition / dec. 2011
- [3] Miller 2017: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/62880/rapid-microbiological-methods-regulatory-acceptance/>
- [4] OWBA 2013: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/140513-Novel-Concept-for-Online-Water-Bioburden-Analysis-Key-Considerations-Applications-and-Business-Benefits-for-Microbiological-Risk-Reduction/>
- [5] Adan 2016 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2015.1128876?journalCode=ibty20>
- [6] Hammes 2010 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-3646-3>
- [7] Diaz 2010 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X09002563>
- [8] Van Nevel 2017 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135417300726>
- [9] Nescerecka 2016 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701216303098>
- [10] Oliver 2005: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15765062/>
- [11] Sandle 2018: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/80557/burkholderia-cepacia-complex-review-of-origins-risks-and-test-methodologies/>
- [12] Martindale et al.: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/experimental-methods-for-microorganism-challenges-on-online-water-bioburden-analyzers-0001>