

## Indice

1.	Glossario .....	1
2.	Introduzione .....	1
3.	Scopo e Campo di applicazione.....	1
4.	Responsabilità e azioni .....	2
5.	Attività .....	2
6.	Strumenti di registrazione.....	5
7.	Allegati.....	6
8.	Bibliografia .....	6

### 1. Glossario

**CFU:** Colony Forming Unit, Unità Formanti Colonia

**Preparazione estemporanea:** preparazione radiofarmaceutica realizzata nel laboratorio di preparazione dei radiofarmaci in base ad una prescrizione medica od alle indicazioni di una Farmacopea.

**SDA:** (Sabouraud Dextrose Agar) terreno di coltura agarizzato Sabouraud destrosio

**SOP:** Procedura Operativa Standard

**Terreno di coltura:** mezzo solido o liquido nel quale avviene la crescita dei microorganismi

**TSA:** (Trypticase Soy Agar) terreno a base di agar con estratto di caseina di soia, è un terreno altamente nutritivo, di uso generale in laboratorio che supporta la crescita di una larga varietà di microrganismi.

### 2. Introduzione

In questa Linea Guida con il termine “bioburden” si indica il numero di microorganismi vitali presenti in un preparato radiofarmaceutico per uso iniettabile prima della sterilizzazione. Il “test di bioburden” consente la determinazione della carica microbica presente nella soluzione bulk di una preparazione radiofarmaceutica, prima di essere sottoposta a sterilizzazione. Fornisce pertanto un significativo valore predittivo dell’applicabilità del metodo che verrà impiegato per la sua sterilizzazione.

### 3. Scopo e Campo di applicazione

Nella presente Linea Guida viene descritta la modalità di enumerazione della popolazione microbica totale nella soluzione del preparato immediatamente prima della fase di sterilizzazione (in autoclave o per filtrazione).

La presente Linea Guida si applica alle preparazioni radiofarmaceutiche estemporanee, escluse quelle che prevedono la marcatura di materiale autologo del paziente, per le quali è possibile solamente la lavorazione in condizioni asettiche (non è possibile alcuna sterilizzazione terminale).

#### **4. Responsabilità e azioni**

I responsabili per la qualità dei radiofarmaci definiti nell'organigramma della Struttura di Medicina Nucleare in accordo con il laboratorio di Microbiologia (interno o esterno) provvedono a stilare una SOP e/o una Istruzione Operativa dove si descrivono dettagliatamente tutte le fasi di esecuzione del test per la determinazione del bioburden. E' responsabilità dell'operatore che esegue il test attenersi a quanto in esse descritto. Nella SOP devono essere descritti anche i dettagli della gestione dei campioni: figure professionali coinvolte, modalità di conservazione prima dell'esecuzione dei test e volumi da utilizzare.

#### **5. Attività**

##### **Preparazione del campione**

Eseguire la preparazione secondo le modalità previste nella SOP/Istruzione Operativa utilizzando tutti i reagenti normalmente impiegati ma senza il precursore radioattivo (denominata sintesi "fredda") e compilare in ogni sua parte il Foglio di Lavoro.

La simulazione della preparazione senza l'uso del precursore radioattivo si rende necessaria per permettere la manipolazione delle soluzioni da testare in condizioni di sicurezza per gli operatori dal punto di vista radioprotezionistico e per la valutazione della popolazione microbica senza l'eventuale interferenza antimicrobica del radionuclide.

Eseguire il conteggio sottoponendo al saggio, la preparazione ottenuta prima del trattamento di sterilizzazione per filtrazione o in autoclave utilizzando l'intero volume del bulk, o comunque non meno di 10 mL, se il volume è superiore.

Se non c'è interferenza sulla crescita microbica e se ci si attende una carica microbica bassa e tale da poter essere contata al termine dell'incubazione, si può usare la soluzione tal quale (questo è generalmente il caso delle preparazioni radiofarmaceutiche), altrimenti si può procedere con una diluizione 1:10 utilizzando una soluzione di sodio cloruro peptone tamponata a pH 7 o tampone fosfato a pH 7.2 o terreno TSB.

##### **Esecuzione del test**

Il test può essere eseguito dal Laboratorio di Microbiologia di una ditta esterna certificata, dal laboratorio di Microbiologia dell'ospedale in cui viene prodotto il radiofarmaco, o dal laboratorio della Medicina Nucleare purché sia applicato un Sistema della Qualità e si faccia riferimento ai metodi e alle indicazioni riportate in Farmacopea. In tutti i casi andranno definiti a priori tempi, modalità di conservazione e di trasporto dei campioni e di esecuzione del test, che dovranno essere riportati nella SOP ed, eventualmente, essere allegati al contratto tecnico.

La formazione del personale coinvolto nella gestione degli aspetti microbiologici dei radiofarmaci (includere le modalità del test oggetto di questa Linea Guida) deve essere adeguata, documentata e periodicamente aggiornata.

### Metodo di filtrazione su membrana

Utilizzare membrane filtranti con dimensione dei pori di 0.45µm. Trasferire il campione sul filtro e filtrare immediatamente. Lavare il filtro con acqua sterile e trasferirlo sul terreno di coltura agarizzato (figura 1).

La Farmacopea Ufficiale prevede l'utilizzo di due diversi terreni di coltura: il terreno TSA per la conta microbica aerobica totale (TAMC, Total Aerobic Microbial Count) e il terreno SDA per la conta di funghi e lieviti (TYMC, Total Yeast/Mould Count).

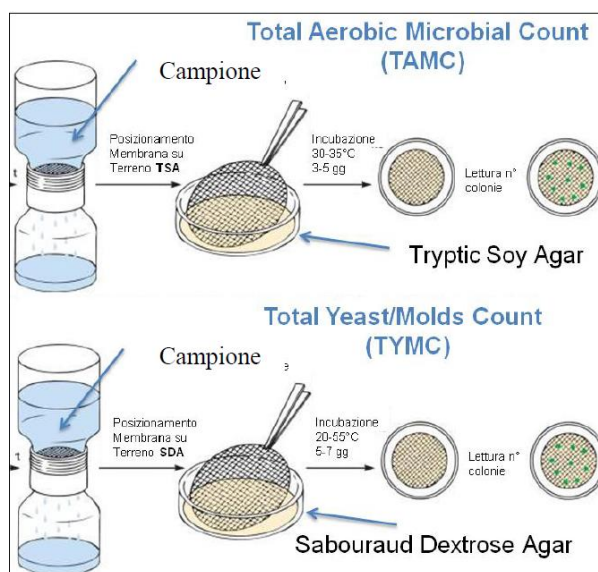
Il filtro in TSA viene incubato per 3-5 giorni a 30-35°C, il filtro in SDA viene incubato per 5-7 giorni a 20-25°C.

E' comunque accettato anche l'utilizzo del solo terreno TSA operando una doppia incubazione: 30-35°C per 2-3 giorni e poi a 20-25°C per 5-7 giorni. Ovviamente questa variazione deve essere commentata e giustificata da un'analisi del rischio.

Alla fine del periodo di incubazione procedere con la conta delle CFU.

Qualora vengano utilizzati i due terreni, il conteggio dei microorganismi sarà rappresentato dalla somma delle CFU cresciute sui due terreni di coltura.

Figura 1 – esempio di metodo di conteggio microbico eseguito su due terreni di coltura.



### Test di fertilità del terreno agarizzato

La fertilità del terreno si intende valida fino alla data indicata sul certificato di lotto del terreno rilasciata dal produttore.

Qualora debba essere eseguito il test di fertilità occorre verificare che il terreno sia idoneo a supportare la crescita dei ceppi ATCC di microorganismi indicati in Farmacopea (tabella 2.6.1-1), ovvero *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* per TSA e *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* per SDA e TSA, inoculandone 50-100 CFU. Incubare per non più di 3 giorni nel caso di inoculo di batteri e non più di 5 giorni nel

caso di funghi. I terreni sono fertili se si verifica una crescita di microorganismi chiaramente visibile. La crescita ottenuta non deve differire di un fattore maggiore di 2 (il doppio o la metà) rispetto al valore dell'inoculo.

I risultati del test di fertilità devono essere riportati su un apposito modulo dove sono indicati anche i lotti dei materiali utilizzati (a titolo esemplificativo si consulti Allegato 1: Modulo per test di fertilità).

### **Convalida del metodo**

Prima di eseguire il test bioburden su un nuovo radiofarmaco, la procedura analitica deve essere convalidata eseguendo un test di idoneità (*Suitability test*) atto a verificare l'assenza di sostanze inibenti la crescita dei microorganismi nel preparato che si intende esaminare.

Il test di idoneità deve essere ripetuto ogni qualvolta vengano apportate modifiche nella formulazione finale della preparazione in esame.

La convalida deve essere eseguita su lotti consecutivi (preferibilmente 3) di preparazione radiofarmaceutica, prevedendo anche un controllo positivo e un controllo negativo per ogni lotto, come proposto di seguito.

Controllo negativo: al posto del prodotto utilizzare acqua per uso iniettabile (WFI) o il tampone sterile eventualmente impiegato per la diluizione.

Controllo in presenza del prodotto: Aggiungere al prodotto da sottoporre al test (A) una soluzione di microorganismi (B) di 50-100 CFU. Il volume dell'inoculo (B) non deve superare l'1% del volume del preparato (A).

Controllo positivo: al posto del prodotto utilizzare acqua per uso iniettabile (WFI) o il tampone sterile eventualmente utilizzato per la diluizione.

Eseguire il test con ciascun microorganismo elencato in Farmacopea, inoculando 50-100 CFU.

La conta dei microorganismi in ciascun controllo in presenza del prodotto non deve differire di un fattore maggiore di 2 rispetto al controllo positivo.

Il controllo negativo non deve presentare alcuna crescita.

## Schema di convalida del metodo

Ceppo di microorganismo	Controllo in presenza del prodotto	Controllo positivo	Controllo negativo
	Terreno	Terreno	Terreno
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA	TSA	TSA + SDA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TSA	TSA	
<i>Bacillus subtilis</i>	TSA	TSA	
<i>Candida albicans</i>	TSA+SDA	TSA+SDA	
<i>Aspergillus brasiliens</i>	TSA+SDA	TSA+SDA	
<b>RISULTATO ATTESO</b>	Crescita comparabile (crescita in presenza del prodotto compresa fra 0,5 e 2 volte la crescita nel controllo positivo)		0 CFU

N.B. Se si utilizza il metodo della doppia incubazione su un solo terreno per tutti i ceppi si esegue la convalida solo con TSA.

### **Frequenza del test**

Non essendo possibile eseguire il test su ogni lotto come richiesto dalla Farmacopea, il test verrà eseguito, con periodicità basata sull'analisi del rischio e definita nella relativa SOP/Istruzione Operativa. E' consigliabile eseguire il test non meno di una volta all'anno.

### **Limite di accettabilità**

Il limite è quello previsto per l'acqua per uso iniettabile e cioè  $\leq 10\text{CFU}/100\text{mL}$ . Dal momento che il volume delle preparazioni radiofarmaceutiche estemporanee prima della filtrazione è nell'ordine delle decine di millilitri, il limite di riferimento pertanto applicato è  $\leq 1\text{CFU}/10\text{mL}$ .

### **Registrazione**

I risultati del *Suitability test* devono essere raccolti su di un modulo, datati e firmati da chi ha eseguito il test e dalle figure responsabili (a titolo esemplificativo si consulti Allegato 2: Modulo per *Suitability test*).

## **6. Strumenti di registrazione**

I risultati del saggio devono essere registrati su un modulo che riporti in modo univoco ed inequivocabile gli estremi che garantiscano la tracciabilità del lotto sottoposto al test, datato e firmato dal responsabile individuato nell'organigramma del laboratorio di microbiologia o della ditta esterna. Tali moduli, controfirmati dal responsabile individuato nell'organigramma del laboratorio di Medicina Nucleare, dovranno essere allegati al foglio di produzione della preparazione esaminata e fanno parte integrante del *Foglio di lavoro*.

I Moduli compilati che raccolgono i dati del test di fertilità (es. Allegato 1) e del *Suitability test* (es. Allegato 2) andranno conservati insieme alla SOP.

## 7. Allegati

- Allegato 1: Modulo per test di fertilità
- Allegato 2: Modulo per *Suitability test*

## 8. Bibliografia

- European Pharmacopoeia: Chapter 2.6.12 Microbiological control of non-sterile products: Microbial enumeration tests
- EMA: Note for guidance on manufacture of the finished product CHMP/QWP/486/95 1996
- EMA: Guideline on manufacture of the finished dosage form, EMA/CPMP/QWP/245074/2015
- EMA: Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container 2016
- PDA: Technical Report n. 1, 2007

**Stesura**

**Verifica e Approvazione**

**Emissione**

---

Gruppo di redazione