

Indice

1. Introduzione	2
2. Scopo e Campo di applicazione	2
3. Responsabilità e azioni	2
4. Attività	2
4.1 <i>Esecuzione del saggio di sterilità secondo il metodo fornito dalla Farmacopea per una preparazione radiofarmaceutica (2.6.1 Sterilità)</i>	4
4.2 <i>Metodi alternativi all'esecuzione del saggio di sterilità da Farmacopea nell'ambito del controllo della qualità microbiologica di una preparazione radiofarmaceutica</i>	5
5. Strumenti di registrazione	6
6. Allegati	7
7. Bibliografia	7

Glossario

Cappa: apparecchiatura dotata di una zona operativa nella quale avvengono le manipolazioni in regime di ventilazione a flusso laminare unidirezionale verticale e omogeneo di aria sterile (filtrata con appositi sistemi), atta a garantire una classe farmaceutica A.

CFU: Colony Forming Unit, Unità Formanti Colonia.

Controcampione: campione di preparazione radiofarmaceutica da tenere a disposizione per controlli successivi, le cui modalità di conservazione sono state stabilite in fase di convalida. Quando possibile dovrebbero essere conservati controcampioni per ciascun lotto/preparazione, per lo stesso periodo della documentazione stabilito dalle NBP-MN. Non sono previsti controcampioni per le preparazioni con materiale autologo del paziente.

FTM (Fluid Thioglycolate Medium, terreno tioglicolato fluido): terreno di arricchimento liquido universale utilizzato per le procedure qualitative dei test di sterilità e per l'isolamento e la coltura di aerobi, anaerobi e microaerofili.

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

SOP: Procedura Operativa Standard.

Terreno di coltura: mezzo, solido o liquido, idoneo a supportare lo sviluppo e la crescita di microrganismi.

Test di fertilità: test eseguito sul terreno di coltura utilizzato nel test di sterilità per verificare la capacità a supportare la crescita di microrganismi.

TSB (Tryptic Soy Broth, brodo di soia triptico, terreno con estratto di caseina di soia): terreno di arricchimento liquido universale usato per le procedure qualitative dei test di sterilità e per l'arricchimento e la coltura di miceti e batteri aerobi.

1. Introduzione

Il saggio di sterilità è un test che permette di valutare la presenza o l'assenza di microrganismi nel campione valutato. E' obbligatorio per tutte le preparazioni e i materiali che devono essere sterili. Il buon esito di un saggio di sterilità non è garanzia di un prodotto sterile: la sterilità è assicurata dall'applicazione di un sistema di assicurazione di qualità convalidato.

Le preparazioni di radiofarmaci marcati con isotopi a breve emivita (da qualche minuto a pochi giorni), possono essere rilasciate per l'utilizzo prima che il saggio della sterilità sia completato.

2. Scopo e Campo di applicazione

Scopo di questa Linea Guida è descrivere l'applicazione del saggio di sterilità descritto in Farmacopea e di fornire indicazioni sull'impiego di metodiche alternative, con particolare riferimento alle preparazioni radiofarmaceutiche.

In generale la finalità del saggio di sterilità, come quella di tutti i saggi, è di fornire a un analista controllore indipendente i mezzi per verificare se un particolare prodotto soddisfi i requisiti della Farmacopea.

La presente Linea Guida si applica alle preparazioni radiofarmaceutiche estemporanee sulle quali il test di sterilità deve essere eseguito obbligatoriamente su ciascun lotto di preparazione.

3. 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 saggio per valutare la sterilità delle preparazioni radiofarmaceutiche. E' responsabilità dell'operatore che esegue il test attenersi a quanto in esse descritto.

Nella SOP devono essere indicate chiaramente le figure professionali coinvolte e devono essere descritti i dettagli della gestione dei campioni: modalità di conservazione prima dell'esecuzione dei test e volumi da utilizzare.

4. Attività

Il livello di assicurazione fornito da un risultato soddisfacente del saggio di sterilità (assenza di unità contaminate nel campione) riguardo alla qualità microbiologica di un lotto deve essere funzione dell'omogeneità del lotto, delle condizioni di fabbricazione e dell'efficienza del piano di campionamento utilizzato. A questo proposito, il campionamento deve essere studiato in modo tale da prevedere l'esecuzione del saggio quanto prima possibile, compatibilmente con la radioattività contenuta nel prodotto radiofarmaceutico e nel rispetto della sicurezza degli operatori incaricati del prelievo.

A titolo esemplificativo si allega un foglio di lavoro interattivo (Allegato 1) che fornisce indicazioni sui tempi minimi di attesa da rispettare prima dell'invio dei campioni ad un laboratorio non abilitato alla manipolazione di radioisotopi, ai sensi del D.Lgs 230/95. Tali tempi dovranno comunque essere concordati con l'Esperto Qualificato della Struttura. Si fa presente che attualmente, per la normativa vigente, nessun preparato contenente radioisotopi con tempo di dimezzamento > 75 giorni (es. Lu-177m) può essere allontanato dalla struttura di preparazione, se non con vettore autorizzato, anche se la concentrazione di attività è < 1 Bq/g.

Se il saggio non è iniziato immediatamente dopo la preparazione, il campione deve essere conservato a temperatura ambiente o a quella in cui si è convalidato il saggio di sterilità mediante *Suitability test*, allo scopo di prevenire risultati falsi negativi. Per campioni di materiale autologo si consiglia la conservazione in frigorifero.

Le condizioni di conservazione prima dell'inizio del saggio (temperatura e tempo) devono essere riportate nella SOP.

Il saggio viene effettuato in accordo con la monografia generale della Farmacopea 2.6.1. Poiché le dimensioni del lotto di un radiofarmaco sono generalmente limitate a uno o pochi flaconi (in alcuni casi pochi millilitri), il numero di campioni e il volume da sottoporre al saggio per ogni lotto indicati nella suddetta monografia non possono essere applicati.

Devono quindi essere impiegati volumi diversi da quelli riportati in Farmacopea purché giustificati sulla base di una analisi del rischio. Normalmente le preparazioni radiofarmaceutiche hanno un volume compreso fra 1 e 40 mL ma, data l'elevata radioattività, il prelievo e la conservazione del campione da sottoporre al saggio di sterilità comporta una notevole esposizione per gli operatori, da cui l'esigenza di utilizzare volumi contenuti per il saggio (tipicamente tra 0.5-1 ml).

Prelievo del campione da sottoporre al test

L'aliquota di campione da sottoporre al test di sterilità deve essere prelevata in asepsi dal contenitore finale contenente la soluzione di radiofarmaco.

Esecuzione del test

Il test può essere eseguito dal laboratorio di Microbiologia di una ditta esterna certificata, dal laboratorio di Microbiologia della Struttura in cui viene prodotto il radiofarmaco, o dal laboratorio della Medicina Nucleare purché sia applicato un Sistema di Gestione Qualità e 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 (incluse le modalità del test oggetto di questa Linea Guida) deve essere adeguata, documentata e periodicamente aggiornata.

Il saggio di sterilità deve essere effettuato in condizioni asettiche, che possono essere ottenute usando, per esempio, una cappa a flusso laminare di classe A situata all'interno di una stanza di classe B o in un isolatore.

Il test di sterilità può essere eseguito nel rispetto del metodo descritto in Farmacopea (saggio 2.6.1), oppure impiegando un metodo alternativo per il controllo della qualità microbiologica.

Un produttore non è tenuto a rispettare necessariamente la metodica riportata in Farmacopea, ma può apportare modifiche al saggio indicato o può impiegare metodi alternativi, purché sia stabilito che il prodotto in questione, se fosse controllato con il metodo ufficiale, soddisferebbe ai requisiti della Farmacopea.

Con questa Linea Guida si conviene pertanto di fornire all'utente gli strumenti per poter eseguire il saggio secondo Farmacopea, e secondariamente, indicazioni su come gestire un metodo alternativo per l'esecuzione di un test di sterilità.

4.1 Esecuzione del saggio di sterilità secondo il metodo convenzionale di Farmacopea per una preparazione radiofarmaceutica (2.6.1 Sterilità)

Il saggio può essere eseguito usando la tecnica di filtrazione su membrana o di inoculo diretto. Per i dettagli tecnici (volumi, soluzione di lavaggio etc) vanno seguite strettamente le istruzioni riportate in Farmacopea o nel proprio metodo (purché convalidato mediante *Suitability test*).

Filtrazione su membrana: utilizzare un filtro a membrana con dimensione dei pori non superiore a 0.45 µm. Trasferire il campione sul filtro e filtrare immediatamente. Lavare il filtro e trasferirlo nel medium di coltura. Alternativamente, se si utilizzano canister, trasferire il medium sulla membrana.

Inoculo diretto: Trasferire il campione direttamente nel terreno di coltura in modo che il volume del prodotto non sia più del 10% del volume del terreno di coltura.

Tempo di incubazione: per entrambi i metodi è di 14 giorni.

Osservazione e interpretazione dei risultati: è consigliabile esaminare i terreni di coltura per verificare la presenza di eventuale crescita microbica ad intervalli regolari durante il periodo di incubazione (ad esempio 3, 5 e 7 giorni).

Riportare nel certificato finale il risultato alla fine del tempo indicato (14 giorni).

Al termine del periodo di incubazione, se non si riscontra una crescita microbica, il prodotto da esaminare soddisfa il saggio di sterilità. Se si osserva una crescita, il prodotto non soddisfa il saggio e viene respinto, a meno che non possa essere chiaramente dimostrato che il saggio non è valido per cause non correlate al prodotto da esaminare. Se il saggio è considerato non valido deve essere ripetuto su un controcampione.

Se si riscontra una crescita di microrganismi, è di fondamentale importanza procedere con l'identificazione del tipo di microorganismo.

Terreni di coltura e temperature di incubazione

Il terreno FTM è destinato principalmente alla coltura di batteri microaerofili. Viene incubato a 30-35°C.

Il terreno TSB è destinato principalmente alla coltura di batteri aerobi ma è anche appropriato per i funghi. Viene incubato a 20-25°C.

La temperatura degli incubatori deve essere monitorata e calibrata.

Test di fertilità

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

Qualora debba essere eseguito il test di fertilità si inoculano porzioni di terreno con microrganismi (50-100 CFU) delle specie elencate nel capitolo di Farmacopea (tab 2.6.1-1) e cioè: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* per FTM e *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* per TSB.

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 microrganismi chiaramente visibile. 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 2: Modulo per test di fertilità).

Convalida del metodo

Prima di eseguire il test di sterilità su un nuovo radiofarmaco, la procedura analitica deve essere convalidata eseguendo un test di idoneità (*Suitability test*) atto a verificare l'assenza nel prodotto da esaminare di sostanze inibenti la crescita dei microorganismi. Il test di idoneità deve essere ripetuto ogni qualvolta vengano apportate modifiche nella composizione del prodotto da esaminare (consigliata con frequenza annuale).

Effettuare il saggio come descritto in "Esecuzione del test", usando lo stesso metodo con le seguenti eccezioni:

filtrazione su membrana: dopo aver trasferito il campione da esaminare su membrana, aggiungere un inoculo di un piccolo numero di microorganismi (50-100 CFU) alla porzione finale di diluente sterile utilizzato per lavare il filtro;

inoculo diretto: dopo trasferimento del campione da esaminare nel terreno di coltura, aggiungere un inoculo di un piccolo numero di microorganismi (50-100 CFU) al terreno.

I microorganismi da utilizzare sono gli stessi utilizzati nel test di fertilità. In parallelo eseguire un controllo positivo (senza campione ma con inoculo di microorganismi) e uno negativo (senza campione e senza microorganismi)

Incubare tutti i recipienti contenenti il terreno di coltura per non più di 5 giorni.

Se alla fine del periodo di incubazione si verificano i seguenti risultati:

- i recipienti contenenti il campione mostrano una crescita confrontabile visivamente con quella del contenitore di controllo positivo senza prodotto
- i recipienti del controllo negativo risultano limpidi

il saggio di sterilità risulta convalidato ed eseguibile routinariamente sul radiofarmaco testato.

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 3: Modulo per *Suitability test*).

4.2 Metodi alternativi al saggio di sterilità da Farmacopea nell'ambito del controllo della qualità microbiologica di una preparazione radiofarmaceutica

Nel corso degli ultimi anni sono stati introdotti metodi alternativi per il controllo microbiologico di sterilità. Alcuni di questi metodi si sono rivelati capaci di dare risultati in tempi reali (o quasi reali) con la possibilità di un'azione correttiva più precoce.

Il capitolo 5.6.1 "metodi alternativi per il controllo della qualità microbiologica" pubblicato in Farmacopea offre una panoramica descrittiva dei metodi microbiologici alternativi, che possono essere complementari o alternativi agli approcci microbiologici convenzionali.

Il capitolo inoltre fornisce una utile guida per la corretta esecuzione della convalida di questi metodi alternativi rispetto ai metodi microbiologici di Farmacopea.

Anche quando il saggio di sterilità è affidato ad un servizio esterno il committente dovrà assicurarsi della tipologia del metodo impiegato e dell'eventuale convalida, qualora il metodo impiegato sia alternativo a quello ufficiale della Farmacopea.

Convalida del metodo alternativo

Dato che molti metodi alternativi comportano l'impiego di specifiche apparecchiature, un punto cruciale per approcciare alla convalida è quello di utilizzare strumentazione

sottoposta a qualifica, inclusi componenti *hardware* e *software* del computer (nel caso sia presente).

Con queste informazioni è possibile procedere con la convalida del metodo alternativo (alcune indicazioni sulla convalida sono disponibili nella sezione 5.6.1-3 della Farmacopea "Requisiti generali di convalida").

Il saggio di sterilità ricade nel gruppo delle determinazioni specifiche per i saggi microbiologici del tipo "saggi qualitativi per verificare la presenza o l'assenza di microrganismi". Nell'analisi microbiologica convenzionale questo tipo di saggio è caratterizzato dalla verifica della torbidità come evidenza della presenza di microrganismi vitali nel campione in esame.

La Farmacopea suggerisce di valutare la precisione di un metodo qualitativo alternativo rispetto a un metodo ufficiale, considerando il grado di accordo tra i due metodi quando le procedure si applicano in modo ripetuto a lotti differenti dello stesso prodotto. Come conseguenza per poter confrontare il metodo standard ed un metodo alternativo è necessario valutare l'accuratezza, la precisione, la specificità, il limite di rivelazione e la robustezza.

Cepi da usare per la convalida

I microrganismi che devono essere utilizzati per i test di comparazione sono i ceppi di riferimento appropriati per il saggio di fertilità ed il saggio di idoneità del metodo ufficiale.

Test da eseguire per la convalida

Accuratezza e precisione

L'accuratezza e la precisione del metodo alternativo possono essere espresse in termini di proporzione relativa tra i falsi positivi e i falsi negativi ottenuti con il metodo nuovo e il metodo di Farmacopea, utilizzando un inoculo standardizzato a bassa concentrazione. Il grado di comparsa di falsi negativi nel campione con i due metodi può essere stimato con l'ausilio di microrganismi di riferimento presenti a bassa concentrazione.

Limite di rivelazione

Il limite di rivelazione di un metodo alternativo qualitativo è il numero più piccolo di microrganismi in un campione che possono essere rivelati nelle condizioni sperimentali descritte.

Robustezza

La robustezza di un metodo alternativo qualitativo è una misura della sua capacità di non essere influenzato dalle variazioni piccole ma deliberate dei parametri operativi, e fornisce un'indicazione dell'affidabilità del metodo in condizioni di saggio normali ma variabili, come differenti analisti, strumenti, lotti di reattivi e laboratori.

5. 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 *batch record*.

I Moduli compilati che raccolgono i dati del test di fertilità (es. Allegato 2) e del *Suitability test* (es. Allegato 3) andranno conservati insieme alla SOP.

Nel caso in cui sia stato convalidato un metodo alternativo al saggio di sterilità da Farmacopea è necessario predisporre di un opportuno report con i dati e le elaborazioni necessarie alla convalida del metodo e della qualifica delle apparecchiature.

6. Allegati

- Allegato 1: Foglio di lavoro Excel per il calcolo dei tempi minimi di attesa prima dell'invio dei campioni, ai sensi del D.Lgs 230/95
- Allegato 2: Modulo per test di fertilità
- Allegato 3: Modulo per *Suitability test*

7. Bibliografia

- Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana edizione corrente, cap. 2.6.1 (Sterilità), cap.5.1 (Argomenti generali sulla microbiologia) e Norme di Buona Preparazione per Medicina Nucleare (NBP-MN).
- Farmacopea Europea, monografia 0125 "Radiopharmaceutical preparations".