



Microbiologia rapida

La bioluminescenza è una tecnologia emergente e approvata e rappresenta un valido strumento analitico per la valutazione immediata della contaminazione microbica in ambiente farmaceutico

La bioluminescenza è un fenomeno osservato in natura, ad esempio nelle lucciole, *Photinus pyralis* (Figura 1). La biochimica di questa manifestazione naturale è conosciuta e studiata già da molto tempo in ambito scientifico e avviene grazie alla reazione tra l'enzima luciferasi e il suo substrato luciferina e la molecola adenosin-tri-fosfato (ATP). Questo nucleotide è una molecola utilizzata da tutte le cellule di organismi animali e vegetali per accumulare energia. Considerando che una cellula danneggiata o morta non è più in grado di produrre questa molecola e che la porzione presente viene in parte degradata, la quantificazione dell'ATP organico può dunque essere un ottimo indice della presenza di cellule vive. La reazione di bioluminescenza si attiva con livelli di ATP estremamente bassi. Ciò ha permesso di applicare tale reazione, con opportuni protocolli di preparazione, alla valutazione della presenza microbica in campioni di varia natura e con gradi di contaminazione molto bassa o nulla. L'analisi di bioluminescenza non permette dunque di discriminare né il tipo né la specie di contaminante, ma di fatto può rapidamente dare una valutazione estremamente precisa paragonabile a un test di "conta totale".

Proprio grazie alla rapidità e affidabilità della reazione, questo principio viene utilizzato in ambito industriale prevalentemente per analisi di igiene ambientale. Negli ultimi anni, però, anche nel controllo qualità dei farmaci, la possibilità di valutare in tempi rapidi e in modo accurato

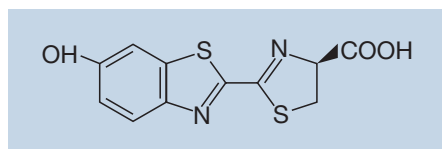


Fig. 1 - Struttura chimica della luciferina

la presenza di un'eventuale contaminazione microbiologica è un'esigenza sempre più sentita. Poiché le tecniche tradizionali hanno l'intrinseca limitazione di fornire risultati molto lontani dal momento del campionamento, anche in questo mercato, tradizionalmente restio ai cambiamenti, cominciano a emergere alcune applicazioni di bioluminescenza. I metodi tradizionali universalmente utilizzati e riconosciuti risultano sostanzialmente inadeguati.

Gli svantaggi della enumerazione in colonie si possono principalmente riassumere nei seguenti punti:

- l'attribuzione della formazione della colonia a opera di un solo microrganismo;
- la possibilità di enumerare la popolazione microbica solo quando compresa tra 0 e 200-300 colonie;
- i lunghi tempi di risposta rispetto al momento del campionamento;
- la grande variabilità dei risultati (30-35%);
- la formulazione del giudizio sostanzialmente visiva e pertanto legata alla "sensibilità" dell'occhio umano che equivale a circa 10^7 , ovvero alla presenza di 10.000.000 di microrganismi.⁽¹⁾

I lunghi tempi di attesa (5-7 giorni per enumerazione su agar o 14 giorni e più per test di sterilità o assenza patogeni) sono imposti dall'attesa che la microcolo-

nia in crescita sia visibile. Nelle variabili "biologiche" del campione, sono incluse anche quelle dovute alla manipolazione, ovvero agli operatori, ai materiali, ai terreni di coltura, alle condizioni colturali ecc. Per tutti questi motivi l'unità di misura convenzionalmente utilizzata quale "UFC" (Unità Formanti Colonie) è difficilmente accettabile con dato "analitico". Ecco pertanto l'esigenza di una reale innovazione anche nell'ambito microbiologico, con l'introduzione di parametri strumentali più obiettivi e più facilmente controllabili pur tenendo conto della natura del campione. Il campione microbiologico infatti, ha un'elevata variabilità intrinseca se confrontata con un campione chimico e che viene generalmente quantificata nell'ambito del 30%.

Una tecnologia rapida è in grado di fornire una valutazione obiettiva, analitica e soprattutto in tempo reale e pertanto offre la possibilità unica di una reazione tempestiva a eventuali deviazioni. Unitamente a questa esigenza, si deve anche considerare la riduzione dei costi vista nella globalità del lavoro del controllo qualità, dove il costo lavoro è quello che più incide sul costo complessivo delle operazioni.

L'esigenza di poter sperimentare una nuova tecnologia deve peraltro confrontarsi con il suo utilizzo in routine. È proprio l'applicazione quotidiana, dove la manipolazione dei campioni e l'esecuzione delle procedure di test sono messe a dura prova, che fornisce le informazioni per quanto riguarda la ripetibilità. La routine perciò diventa un banco di prova alquanto difficile per l'implementazione di un nuo-

