

NCF

notiziario
chimico
farmaceutico



CAPSULIT
Safety Closures for Pharma Industry

EURACONSULT
2003



INGFERRARI

INCE
FARMACIA E FARMACIA
NUTRIZIONE E COSMETICI
FARMACIA E FARMACIA

ITECO
ENGINEERING



VTU
engineering

ACHIEVE COMPLIANCE

PQE GROUP
GLOBAL QUALITY SOLUTIONS

pqegroup.com
info-service@pqegroup.com

gging ccino

Ozonizzatori e contaminazione microbica



Uno studio del Laboratorio Microbiologico di Istituto de Angeli ha messo alla prova l'efficacia di questi dispositivi, quantificandone l'effettiva capacità germicida in ambienti di produzione farmaceutica non sterile

La contaminazione microbica degli ambienti farmaceutici rappresenta una delle variabili fondamentali da monitorare per garantire la purezza, la qualità e la sicurezza durante tutto il processo di produzione farmaceutica. Esistono svariate tipologie di strumenti e tecnologie per eseguire tale attività e poter così mantenere l'area produttiva nella classe GMP di appartenenza. L'Annex 1 delle GMP prevede, a seconda

della classe di appartenenza del locale produttivo, un numero massimo di unità formanti colonia per superficie da un valore <1 per la classe A, a un massimo di 50 per la classe D. Nella scelta di una metodica di sanitizzazione è necessario prendere in considerazione molti fattori, *in primis* l'attività germicida del prodotto, ma anche le modalità operative, eventuali concentrazioni e tempi di contatto, gli aspetti di sicurezza oltre che la compatibilità con i materiali da trattare. Tra le tecnologie alternative di possibile utilizzo troviamo la disinfezione con ozono, un gas con un altissimo potere ossidante con la particolarità di dissolversi senza lasciare traccia o residui chimici.

Il suo elevato potere ossidante e la sua naturale tendenza a riconvertirsi in ossigeno molecolare (O₂) lo rendono un gas dalle elevate proprietà di impiego in molte applicazioni per l'abbattimento microbico di aria e acqua. La sua particolare instabilità non gli permette di essere immagazzinato e di conseguenza deve essere prodotto nel luogo dove viene utilizzato, in assenza di personale. L'utilizzo di gas di ozono (O₃) per la sanitizzazione degli ambienti farmaceutici ha tempi rapidi di azione, non è corrosivo sugli *equipment* di produzione, non interagisce con materie prime e prodotti finiti e, secondo recenti studi, non causa l'insorgenza di fenomeni di resistenza batterica. Uno studio condotto dal Laboratorio Microbiologico di Istituto de Angeli - Fareva di Reggello (FI), in collaborazione con Sanity System Italia Srl, si è posto l'obiettivo di verificare l'efficacia dell'attività battericida/fungicida dell'ozono nel ridurre una carica microbica nota in un tempo di azione di 85 minuti. L'ozono utilizzato per le prove è stato prodotto dal generatore Sany-Plus (ciclo di maggiore durata preimpostato nello strumento). L'effetto del trattamento ozonizzante è stato valutato su piastre seminate con microrganismi a titolo noto (range 10²-10⁵ UFC/piastra) dei seguenti microrganismi: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* per valutare l'attività battericida, *C. albicans* e *A. brasiliensis* per l'attività fungicida e *B. subtilis* per l'attività sporicida. Sono stati inoltre inclusi nello studio anche gli isolati ambientali *S. marcescens* e *B. cepacia*.

Preparazione dei ceppi ed esecuzione delle prove

Per l'esecuzione delle prove sono state preparate delle sospensioni dei ceppi selezionati con torbidità McFarland calcolata per il raggiungimento di una concentrazione teorica di 10⁸ UFC/ml. A partire dalla sospensione con titolo 10⁶ UFC/

Materiali e metodi dello studio

Microrganismi utilizzati:	ATCC 8739 (EC), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 (PA), <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (SA), <i>Serratia marcescens</i> wild (SM), <i>Burkholderia cepacia</i> wild (BK)	Terreni e diluenti: Tryptic Soya Agar (TSA), Sabouraud Agar (SA), Soluzione fisiologica.
		Attrezzatura: generatore di ozono Sany-Plus (Sanity System Italia srl).

ml e per le diluzioni successive è stata effettuata la semina su superficie di 100 µl in piastre di TSA per i batteri e SA per i funghi. Per valutare l'effettivo titolo delle sospensioni sono stati seminati 100 µl della sospensione 10³ UFC/ml in piastra (titolo teorico in piastra 10² UFC). Le condizioni d'incubazione sono state le seguenti: piastre di TSA a 30-35°C per cinque giorni e SA a 20-25°C sempre per cinque giorni.

Il generatore di ozono SanyPlus prevede tre diversi cicli da effettuare in base alla metratura del locale da sottoporre al trattamento. A scopo cautelativo è stato scelto il programma di massima durata (85 minuti), finalizzato a saturare ambienti fino a 400 m³. I test sono stati effettuati in quattro locali con i seguenti volumi: locale 1 di 140 m³, locale 2 di 160 m³, locale 3 di 220 m³ e locale 4 di 380 m³. Le prove preliminari, effettuate utilizzando uno strumento per locale, hanno mostrato una sopravvivenza cellulare maggiore di quella inizialmente ipotizzata (i dati non vengono riportati in questo articolo). Per ovviare a questo problema e al fine di garantire una saturazione più efficiente, il trattamento è stato ripetuto utilizzando due ozonizzatori nei locali 1, 2 e 3, mentre nel locale 4 è stato effettuato il programma utilizzando tre strumenti in contemporanea. I test sono stati eseguiti in assenza di personale, a macchinari spenti e con impianto di condizionamento fermo. Le porte e i SAS dei locali sottoposti a sanitizzazione sono stati sigillati per evitare la dispersione di ozono durante i test. Le piastre contenenti gli inoculi dei microrganismi selezionati sono state posizionate all'interno dei locali in specifiche aree delimitate.

Il posizionamento delle piastre è stato valutato con lo scopo di coprire la massima superficie disponibile. Al termine del trattamento le piastre sono state incubate alle condizioni previste da Farmacopea (TSA a 30-35°C per cinque giorni, SA a 20-25°C per cinque giorni).

TABELLA 1 – RISULTATI LOCALE 1, 2, 3 E 4 SOTTOPOSTI A UN CICLO DI OZONO DA 85 MINUTI

	N ₀	N _a 1	N _a 2	N _a 3	N _a 4	RIDUZIONE % MEDIA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	136000	6	9	18	17	99.99
	13600	1	2	3	15	99.96
	1360	1	1	2	2	99.89
	136	0	0	0	1	99.26
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	78000	8	134	135	266	99.83
	7800	1	6	8	20	99.89
	780	1	1	3	2	99.78
	78	0	0	2	2	98.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	107000	357	526	954	1340	99.26
	10700	150	430	493	700	95.86
	1070	54	92	109	15	90.89
	107	8	7	11	14	90.65
<i>Serratia marcescens</i> wild	179000	26	39	68	81	99.97
	17900	5	7	13	25	99.93
	1790	1	0	2	9	99.82
	179	0	0	2	1	99.30
<i>Burkholderia cepacia</i> wild	83000	15	27	52	102	99.95
	8300	4	3	12	17	99.91
	830	0	1	2	2	99.85
	83	0	0	2	1	99.76
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	109000	36	76	136	502	99.83
	10900	4	18	33	94	99.66
	1090	1	2	9	15	99.38
	109	1	0	2	3	98.39
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	128000	114	148	316	385	99.81
	12800	27	32	52	63	99.66
	1280	4	4	5	8	99.59
	128	2	2	3	5	97.66
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	140000	174	784	592	973	99.55
	14000	48	238	165	596	98.13
	1400	7	87	46	150	94.82
	140	4	12	7	21	92.14

N₀ media numero effettivo di microrganismi inoculati; N_a microrganismi per piastra sopravvissuti al test alla fine del tempo di contatto per il locale 1, 2, 3 e 4.

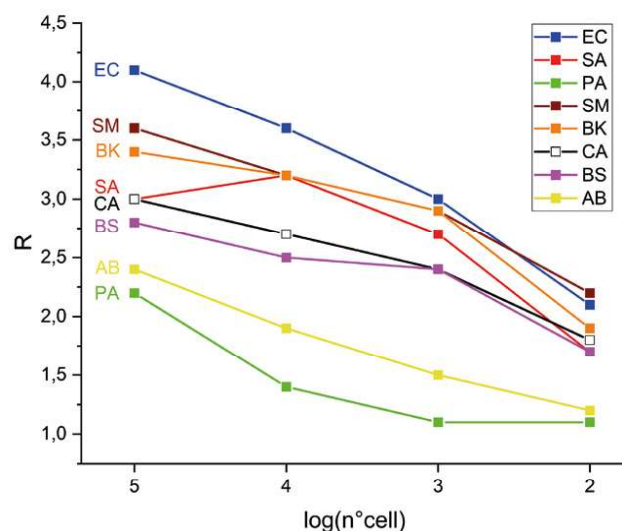


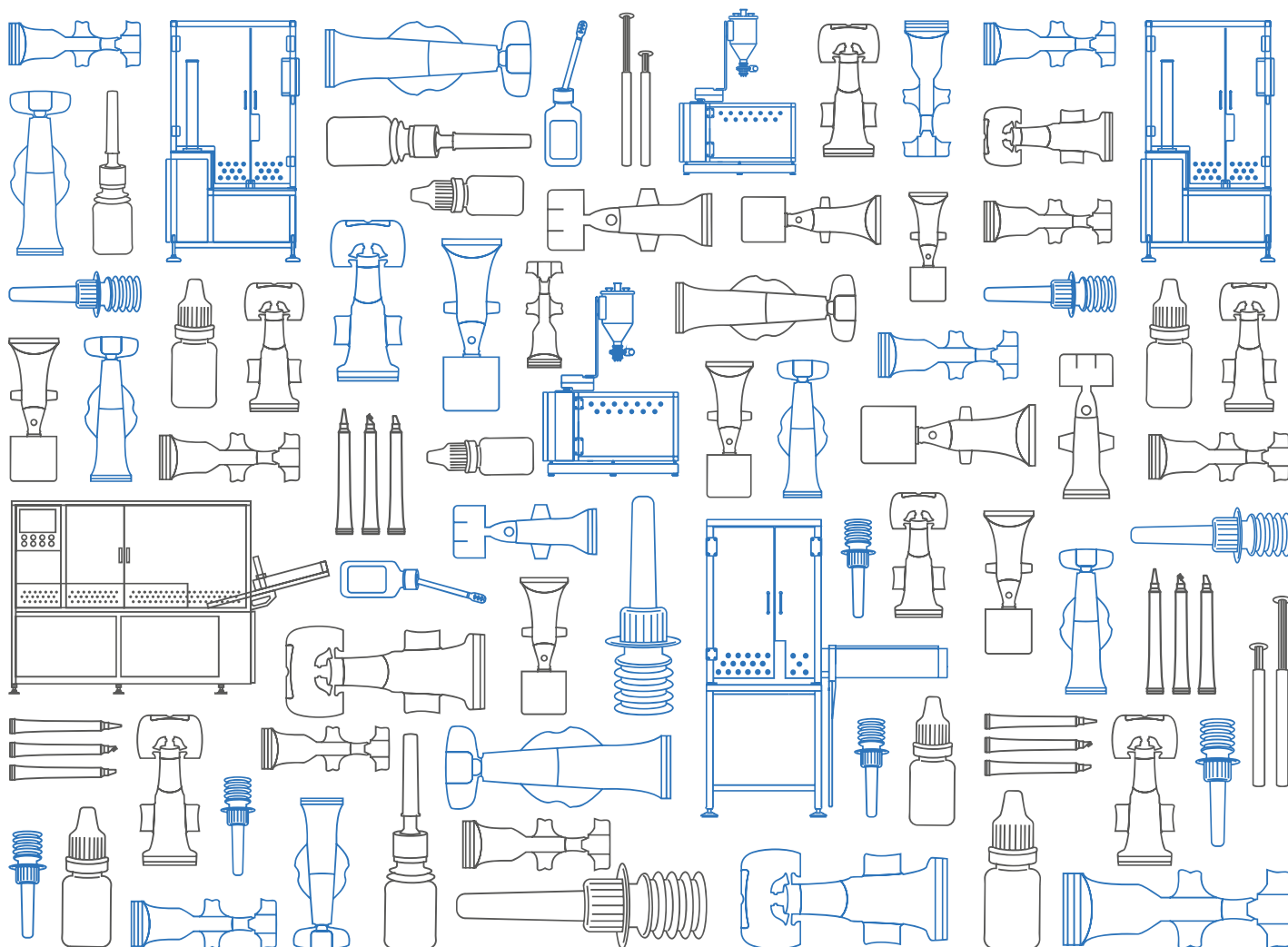
Figura 1 - Risultati relativi alla media delle quattro prove effettuate

Calcolo della sopravvivenza e risultati

Al termine dell'incubazione prevista è stata effettuata la conta dei microrganismi vitali presenti sulle piastre. Per ogni ceppo è stato necessario valutare il titolo effettivo di cellule inoculate rispetto al titolo teorico in base ai valori ottenuti nella piastra di controllo. Il numero di colonie ottenuto è stato moltiplicato per il fattore di diluizione, ottenendo il numero effettivo di cellule di ogni inoculo. Per ciascun microrganismo è stata quindi calcolata la riduzione logaritmica della vitalità (R) applicando la seguente formula:

$$R = \log (N_0/N_a)$$

dove N₀ è il numero effettivo di microrganismi inoculati e N_a è il numero di microrganismi per piastra sopravvissuti al test alla fine del tempo di contatto. Le prove sono state effettuate nei quattro locali in contemporanea. Per ogni ceppo il titolo iniziale (N₀) è stato ottenuto effettuando la media dei valori ottenuti per i quattro locali. Nella Tabella 1 sono riportati i dati ottenuti, mentre nella Figura 1 sono riportati i valori medi delle riduzioni logaritmiche di ogni ceppo. Ogni punto rappresenta la media dei quattro valori ottenuti in funzione del numero di cellule. L'inoculo più basso, determinato da un titolo iniziale di 10², costituisce a tutti gli effetti il punto più rappresentativo delle possibili contaminazioni microbiche riscontrabili nei locali



IL PACKAGING FARMACEUTICO SI REINVENTA



Lameplast

A TEKNI-PLEX BUSINESS

SAREMO PRESENTI A

ACHEMA
PULSE

DAL 31 MAGGIO
AL 30 GIUGNO
2021

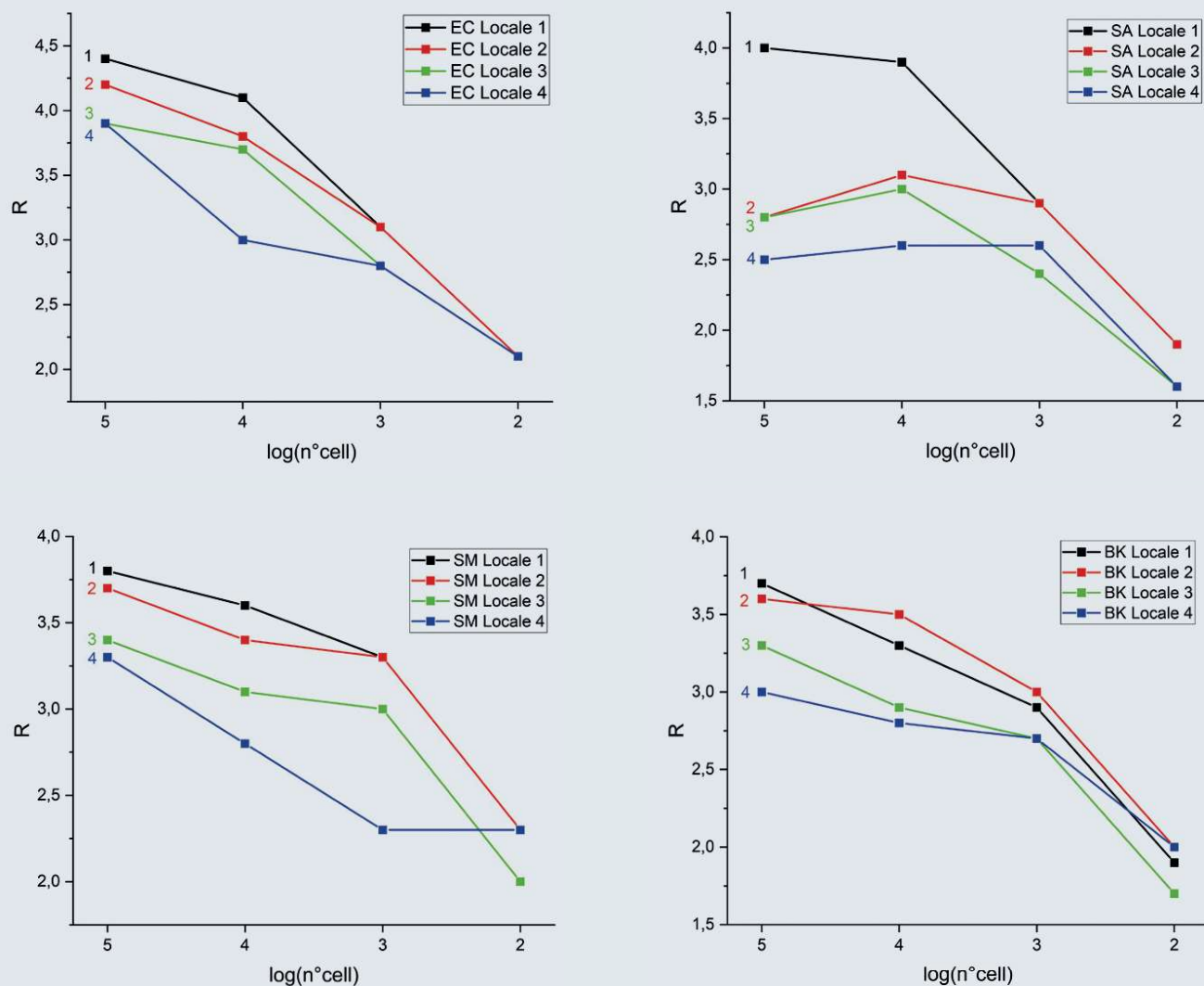
www.lameplast.it

lameplast@tekni-plex.com

TEKNI-PLEX
HEALTHCARE PACKAGING

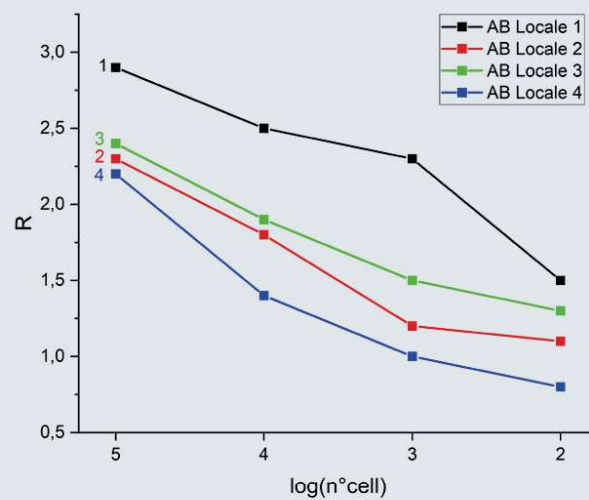
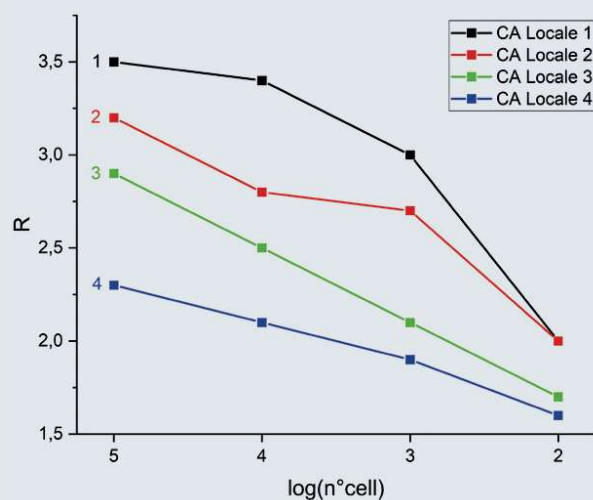
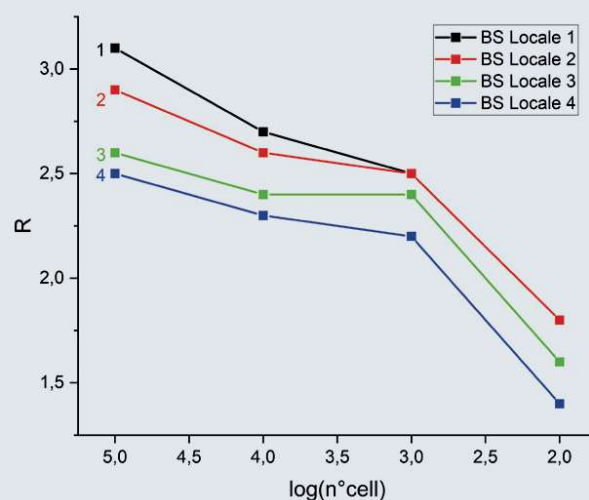
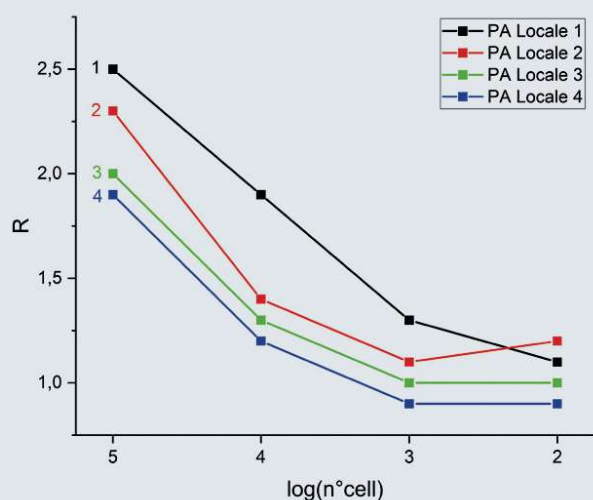
PRODUZIONE

Figura 2 - Risultati ottenuti per ogni ceppo saggiato. In ogni grafico sono riportati i valori ottenuti in ogni locale messi a confronto



di produzione farmaceutica non sterile. Come è possibile osservare dai dati, per la maggior parte dei ceppi in questo range sono stati trovati valori in seguito a ciclo con ozono in media di 0 e 1 UFC/piastra. Sei microrganismi (EC, SA, CA, BS, SM, BC) sono infatti al limite della sensibilità del trattamento, con una mortalità cellulare media del 98,6%, mentre due microrganismi hanno riportato tassi di mortalità inferiori (90,7% per PA,

92,1% per AB). È importante considerare che valori di titolo iniziale così basso portano a una sottostima dell'efficienza della sanitizzazione. Per avere una valutazione più rappresentativa dell'efficacia del metodo sono stati quindi analizzati i dati ottenuti da titoli cellulari iniziali più alti, pur essendo lontani dai valori normalmente riscontrabili in ambito farmaceutico. Osservando i dati relativi a concentrazioni maggiori si nota che l'efficienza del metodo



tende a crescere aumentando il numero di cellule. In tutti i microrganismi si ottiene infatti il valore più alto di riduzione logaritmica per l'inoculo dell'ordine di grandezza maggiore (10^5 UFC/piastra), valore di gran lunga superiore a quelli di norma riscontrati degli ambienti produttivi. Considerando l'andamento complessivo dei vari microrganismi, la Figura 1 evidenzia delle differenze nell'efficienza del metodo in base al microrganismo e in modo proporzionale per

ciascuna diluizione applicata. Nel valore di contaminazione iniziale più alto (10^5 UFC/piastra) l'attività battericida risulta ottimale sia per i microrganismi ATCC (*E. coli* e *Staphylococcus aureus*), che per gli isolati ambientali (*Serratia marcescens wild* e *Burkholderia cepacia wild*), con una riduzione logaritmica media di 3.5. L'attività fungicida su *Candida albicans* risulta leggermente inferiore in termini di riduzione logaritmica ($R=3.0$), valori molto simili a quelli

ottenuti da *Bacillus subtilis* ($R=2.8$). Hanno ottenuto valori sensibilmente più bassi *Pseudomonas aeruginosa* ($R=2.2$) e *Aspergillus brasiliensis* ($R=2.4$). I valori di efficacia più bassi riscontrati nei microrganismi sporigeni sono probabilmente correlati a una maggior resistenza delle spore. Anche la natura del substrato su cui sono collocate le spore influenza il tasso di inattivazione, mentre la porosità dei materiali è stata correlata con il tasso di efficienza dell'ozono su vari microrganismi. Tra le forme vegetative sottoposte al test, *Pseudomonas aeruginosa* ha dimostrato una suscettibilità all'ozono nettamente inferiore rispetto alle altre. Tale caratteristica è forse attribuibile alla tendenza del microrganismo a formare aggregati sulla superficie della piastra, meccanismo correlato con fenomeni di resistenza a ozono. Tale evidenza resta tuttavia un dato da sottoporre a ulteriori indagini. I risultati ottenuti nel locale 1 mostrano complessivamente valori di R più alti rispetto agli altri locali. Questo risultato è stato attribuito a un maggiore volume dei locali 2, 3 e 4, sia del locale stesso sia dell'impianto di areazione in cui il gas si diffonde.

Uno strumento efficace

L'ozonizzatore, alla luce dello studio effettuato, è risultato un valido aiuto nel processo di sanificazione dei locali di produzione farmaceutica. Il facile utilizzo dello strumento e la possibilità di usufruire del locale al termine del ciclo dopo 15 minuti di areazione lo rendono una valida scelta nella sanitizzazione dei locali di produzione farmaceutica non sterile. I dati ottenuti hanno dimostrato in generale un forte abbattimento delle cariche dei microrganismi esposti a ozono, tuttavia è necessario segnalare che sono emersi alcuni ceppi critici. Tra i microrganismi saggiati, i funghi e i microrganismi sporigeni sono risultati meno suscettibili all'esposizione a ozono. Inoltre anche *P.aeruginosa* ha mostrato di essere meno suscettibile rispetto agli altri microrganismi. In conclusione, i risultati ottenuti hanno evidenziato l'efficacia dell'ozono come potenziale supplemento nella sanificazione degli ambienti farmaceutici. I test hanno dimostrato un'efficacia di abbattimento di un titolo iniziale di 10^5 cellule del 99,7%, con una riduzione logaritmica di 3.2 per i microrganismi non sporigeni e



L'ozonizzatore, visti i dati raccolti, è risultato essere uno strumento efficace nella sanificazione dei locali di produzione farmaceutica. I funghi e i microrganismi sporigeni si sono dimostrati di media i più resistenti al trattamento con ozono

di 2.6 per gli sporigeni. L'efficacia calcolata su valori di inoculo di 10^2 UFC/piastra, dove la variazione statistica è maggiore, corrisponde a una riduzione logaritmica di 1.8 per i microrganismi non sporigeni e 1.4 per gli sporigeni. In conclusione, vista la riduzione complessiva di almeno 1.6 per il valore più basso di inoculo, e col presupposto che sulle superfici farmaceutiche di classi non sterili difficilmente ci sono più di 100 UFC/piastra, lo strumento è risultato idoneo per l'obiettivo di sanificazione prefissato.

Bibliografia

1. A.Brodowska et al., *Modelling the Ozone-Based Treatments for Inactivation of Microorganisms*, Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(10):1196
2. A.Aydogan, Mirat D.Gurol, *Application of Gaseous Ozone for Inactivation of Bacillus subtilis Spores*, J Air Waste Manag Assoc, 2012, 56:179-185
3. C.Chiellini et al., *A new method for long-term storage of titred microbial standard solutions suitable for microbiologic quality control activities of pharmaceutical companies*, J Microbiol Methods, 2016, 127:10-12
4. European Commission, *Annex 1: Manufacture of sterile products*
5. G.Giuliani et al., *Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone*, Ozone Therapy, 2018, 3:48-51
6. M.Martinelli et al., *Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology*, J Prev Med Hyg, 2017,58:E48-E52
7. M.Y.Mentrez et al., *An Evaluation of the Antimicrobial Effects of Gas-Phase Ozone*, Journal Int Ozone Assoc, 2009, 31:316-325
8. N.F.Gray, *Ozone Disinfection*, Microbiol Waterborne Diseases, 2014, 599-615
9. S. Heß, C.Gallert., *Sensitivity of antibiotic resistant and antibiotic susceptible Escherichia coli, Enterococcus and Staphylococcus strains against ozone*, J WaterHealth, 2015, 13(4):1020-1028
10. U.S.P. 42 <1072> *Disinfectants and aseptics*, current edition

Autori

Valentina Melani, Microbiological Analyst
Alessandro Pinzani, Microbiological Lab Manager
Laura Xenia Pricop, Microbiological Analyst