



# FARMACOPEA

## Saggi biologici

*Prof.ssa Vivian Tullio*



# FARMACOPEA

## Saggi biologici di sicurezza



### LA FARMACOPEA

è l'elenco ufficiale in cui sono registrati i nomi di tutti i preparati medicinali in uso, con la descrizione delle loro formule, dei requisiti analitici, dei metodi di preparazione ecc.,

**Indica come preparare i farmaci  
e come effettuare i controlli.**

**In campo microbiologico** sono indicati i saggi biologici di sicurezza da effettuare prima di immettere un prodotto in commercio.

# FARMACOPEA

## Saggi biologici di sicurezza



### LA FARMACOPEA

I prodotti iniettabili devono essere sottoposti a



Controllo di sterilità



Verifica dell'assenza dei pirogeni



Verifica dell'assenza di tossicità



Prova di iniettabilità

# FARMACOPEA

## Controllo di Sterilità

I prodotti farmaceutici **iniettabili** (es. acqua per sciogliere i prodotti iniettabili) devono essere sterili, ovvero esenti da microrganismi (batteri e funghi).



I **virus** non vengono presi in considerazione in queste prove perché:

- E' difficile che siano presenti nell'acqua
- Bisogna effettuare prove di laboratorio diverse e mirate

# FARMACOPEA



## IL CONTROLLO DI STERILITÀ

deve essere effettuato in condizioni di asepsi, l'industria non deve contaminare i prodotti; le prove vanno effettuate sotto cappa (meglio a flusso laminare perché più sicura).

## L'AMBIENTE

dove si fanno le prove deve essere sterile (accendere UV o disinfettare con formaldeide), mentre si eseguono le prove i disinfettanti ambientali non devono interferire.

# FARMACOPEA

## Numero dei campioni da prelevare

Il prodotto è contenuto in contenitori (da 1ml a 1 litro) che rappresentano una **partita o lotto**, ovvero un insieme omogeneo di recipienti pieni, contenenti la stessa preparazione.

Si esegue la prova prendendo alcuni campioni del lotto a caso.

*La Farmacopea indica quanti a seconda del numero di recipienti di cui è composta la partita.*



# FARMACOPEA

## Numero dei campioni da prelevare

<b>N° recipienti di cui è composto il lotto</b>	<b>N° recipienti da prelevare</b>
<b>Non superiore a 100</b>	<b>10% (minimo 4)</b>
<b>100, ma &lt; 500</b>	<b>10</b>
<b>500</b>	<b>2% max 20</b>



# FARMACOPEA

## Numero dei campioni da prelevare

Quantità contenuta in ciascun recipiente	Quantità da utilizzare in ciascun controllo (batteri e miceti)
<b>Liquidi</b>	
Fino a 1 ml	Intero contenuto
Da 1ml a 4 ml	Metà contenuto
Da 4 ml a 20 ml	2 ml
>20 ml	10% del contenuto
<b>Solidi (vanno sciolti)</b>	
Fino a 50 mg	Intero contenuto
Da 50 a 200 mg	Metà contenuto
>200 mg	100 mg



# CONTROLLO DI STERILITA' DEL PRODOTTO



## METODO IN LIQUIDO

(valutazione della eventuale presenza di microrganismi)



### TERRENI DI COLTURA

*Batteri aerobi:* Nutrient Broth o Brain Heart Infusion broth  
**Ceppo test:** *Staphylococcus aureus*



### TERRENI DI COLTURA

*Batteri anaerobi:* Tioglicolato di sodio  
**Ceppo test:** *Clostridium sphenoides*



### TERRENI DI COLTURA

*Funghi:* Sabouraud dextrose Broth  
**Ceppo test:** *Candida albicans*

Eeguire le prove in doppio, riempire tante provette, in base al numero dei campioni x2, con 5 ml di terreno (10 ml con terreno per anaerobiosi per ridurre la quantità d'aria tra il terreno e il tappo della provetta)

# CONTROLLO DI STERILITA' DEL PRODOTTO

## SOSTANZE DA ANALIZZARE



Le *polveri* vengono *disciolte* in appropriato liquido sterile e poi immesse nei terreni



I *liquidi* vengono *immessi direttamente*

# CONTROLLO DI STERILITA' DEL PRODOTTO

## SOSTANZE DA ANALIZZARE



I *liquidi oleosi vengono disciolti* in solventi appropriati



*Neutralizzazione* delle proprietà antimicrobiche tramite diluizioni o filtrazione

(se le sostanze contengono conservanti o antibiotici bisogna bloccare la loro attività; quando conservanti e antibiotici si trovano in polvere nel composto essi sono inattivi: diventano attivi se disciolti in liquido)

# CONTROLLO DI STERILITA' DEL PRODOTTO

## SOSTANZE DA ANALIZZARE



### PROVA DI FERTILITA' (F)

- ❖ Serve per verificare che il terreno usato permetta la crescita dei microrganismi
- ❖ Seminare i batteri test nel terreno che si usa per fare le prove



### PROVA DI STERILITA' DEL TERRENO (C)

- ❖ Serve per verificare che il terreno usato sia sterile
- ❖ Preparare a parte delle provette contenenti aliquote dei diversi terreni usati



### INCUBAZIONE

- ❖ Per ricerca batteri: 48 ore a 30-37°C
- ❖ Per ricerca funghi: almeno una settimana a 25-30°C

# LETTURA E INTERPRETAZIONE RISULTATI



Le provette devono risultare limpide cioè sterili



F (controllo di fertilità) = torbido



C (controllo del terreno) = limpido



Alcune provette torbide anche nella prova in doppio = campione probabilmente contaminato, rifare la prova per verificare



Alcune provette torbide solo in una delle due prove in doppio = contaminazione probabile



**Per qualsiasi alterazione di C ed F rifare le prove se**

➤ **F = limpido → rifare**

➤ **C = torbido → rifare**

# METODO IN SOLIDO

Segue lo stesso principio del liquido ma si **usano terreni agarizzati**

Il campione liquido viene filtrato attraverso le membrane dei “filtri a caffettiera”.

La membrana con pori di 0.2 micron raccoglie eventuali batteri e funghi presenti nel campione

Si preleva sterilmente con pinzette sterili la membrana e la si **taglia in tre parti** con forbici sterili.

Ogni porzione va appoggiata al centro di una piastra Petri contenente terreno agarizzato



**Piastra N°1 con Nutrient agar per la ricerca dei batteri aerobi**



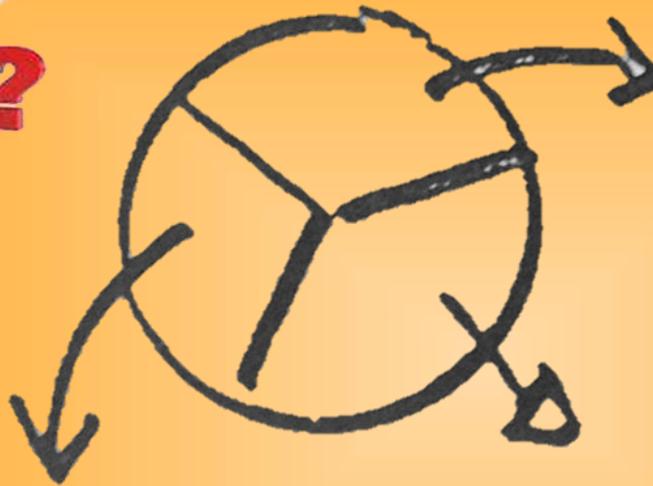
**Piastra N°2 con Nutrient agar per la ricerca dei batteri anaerobi**



**Piastra N°3 con Sabouraud dextrose agar per la ricerca dei miceti**



# METODO IN SOLIDO



**Piastra per miceti**  
**Sabouraud**  
**Dextrose Agar**  
**25°C**

**Piastra per batteri**  
**anaerobi**  
**37°C in CO<sub>2</sub>**  
**Nutrient agar**

**Piastra per batteri**  
**aerobi**  
**37°C**  
**Nutrient agar**

# METODO IN SOLIDO

## INCUBARE



Piastra N°1 a 37°C in aerobiosi per 24-48 ore



Piastra N°2 a 37°C in anaerobiosi (10% CO<sub>2</sub>) per 48-72 ore



Piastra N°3 a T° ambiente (circa 25°C) per 3-4 giorni

## LETTURA



Eventuali colonie sulla membrana = prodotto contaminato



Colonie cresciute sul terreno fuori della membrana = contaminazione da parte dell'operatore (rifare la prova)



Colonie cresciute sul bordo della membrana, in parte sul terreno = probabile contaminazione del prodotto, ma rifare la prova





## SAGGIO VERIFICA assenza tossicità

### PROVA DI INNOCUITA'

#### Prova per vedere se il prodotto non contiene sostanze tossiche

Iniettare per via endovenosa in un lotto di topolini sani (almeno 5 e in numero dispari), dal peso di 20-30gr la quantità da esaminare (vedere le singole monografie), disciolta in 0.5 ml di soluzione fisiologica.

Tempo di inoculo (iniettare lentamente nella vena caudale): 15-30 secondi.

**Il risultato è favorevole se nessun animale muore in 24 ore.** In caso anche di un solo decesso, ripetere la prova perché il prodotto può essere tossico.



## SAGGIO INIETTABILITA'

**Nella Farmacopea non è più riportata perché è impensabile che la ditta non sappia se il prodotto sia iniettabile o meno.**

Iniettare una piccola quantità di prodotto in una cavia (porcellino d'India) di 250g circa, per via parenterale sulla schiena, dopo aver rasato la zona di inoculo.

L'animale non deve presentare alcun rossore né manifestare alcun sintomo di danno locale e/o cambiamenti di comportamento.



## SAGGIO DI VERIFICA

# ASSENZA DI ATTIVITÀ PIROGENA

Una sostanza ha attività pirogena quando aumenta la T° corporea.

Le sostanze con queste caratteristiche sono quelle legate all'LPS dei batteri Gram negativi (porzione lipidica = endotossina),

Si mette in evidenza un'eventuale presenza di LPS, quindi contaminazione batterica.

se c'è un batterio vivo lo metto in evidenza con la **prova di sterilità**,  
se c'è un batterio lisato lo metto in evidenza con il **saggio dei pirogeni**.



## SAGGIO DI VERIFICA

### METODO MODERNO LIMULUS TEST (L.A.L)

Si parte dal presupposto che le endotossine reagiscono con cellule particolari derivate dall'artropode *Limulus polyphemus*.

L'aggiunta di una soluzione contenente endotossina ad una soluzione di lisato di amebociti estratto dall'animale determina intorbidimento, precipitazione o gelificazione della miscela

Nel saggio sono inclusi controlli positivi e negativi. La reazione richiede la presenza di cationi bivalenti, ed enzimi

La velocità di reazione dipende dalla concentrazione di endotossina, dal pH e dalla  $T^{\circ}$ . La lettura è visiva.



# SAGGIO DI VERIFICA

## METODO MODERNO LIMULUS TEST (L.A.L)



### *Limulus polyphemus* and the Limulus Lysate Test

Granule membrane fusing with adjacent granule membrane

Emptied granules exposed to extracellular environment

Amoebocytes are bred from the *Limulus* by cardiac puncture using siliconized syringes. The extracted cells are used to produce the *Limulus* lysate. No isolation procedures are necessary since amoebocytes are the sole coagulating cells found in the blood of the *Limulus*.

Upon exposure to certain substances, coagulation occurs transforming the amoebocytes in the following manner:

- A flattening of the cell increasing its diameter
- The formation of long processes extending from cell to cell
- A pronounced aggregation through exocytosis

Once the necessary blood has been extracted, the *Limulus* is returned to the well.

Diagram of the *Limulus polyphemus* and its role in the *Limulus* lysate test used to detect or locate gram-negative bacterial endotoxins (pyrogen). These substances stimulate the coagulation of the amoebocytes in the *Limulus* lysate. This procedure is widely accepted and used by the pharmaceutical industry to locate sources of antibiotic impurities in water, glass and other materials used in production. It's also utilized in the diagnosis of gram-negative meningitis.



# TITOLAZIONE MICROBIOLOGICA

## TITOLAZIONE SOSTANZE A BASSA CONCENTRAZIONE

Saggio che si effettua quando certe sostanze non possono essere titolate con i metodi precedenti perché a concentrazioni troppo basse.

Ad es. **AMINOACIDI E VITAMINE.**

## SAGGIO DELLA VITAMINA B12

Come quantificare la VitB12 nell'olio di fegato di merluzzo?

Si parte dall'organo con pesi e volumi diversi a seconda del merluzzo

(merluzzo piccolo = fegato piccolo;

merluzzo grande = fegato grande)

# TEST VITAMINA B12

1

➔ Diluizioni dalla soluzione madre nota di VitB12 (cianocobalamina **STANDARD** che si prepara mediante cromatografia)

Dallo standard si ottengono due diluizioni note:

**0.1 mcg/ml e 0.01 mcg/ml.**

Per legge devo avere nell'olio di fegato di merluzzo o nelle capsule 3-5 mcg di VitB12/grammo di estratto di fegato.

Se nell'estratto c'è

una quantità inferiore = **Frode,**

una quantità superiore = **Pericoloso.**



# TEST VITAMINA B12

2

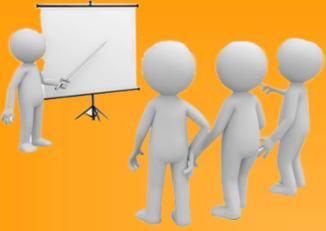


Immagino che nel mio estratto ci siano

3-5 mcg di VitB12 e faccio diluizioni ipotetiche fino a raggiungere 0.1 mcg e 0.01 mcg/ml.

Il Saggio è come un **antibiogramma** ma qui si leggono gli  
**ALONI DI CRESCITA.**





# TEST VITAMINA B12



Si prepara del terreno agarizzato



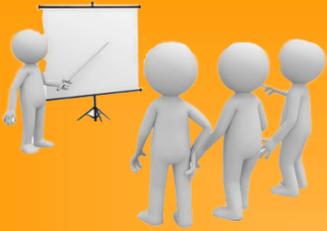
prima di versarlo nelle piastre si aggiunge l'1% di una soluzione di cloruro di trifenitetrazolio al 2% p/v in acqua (colora in viola i batteri cresciuti)



e la sospensione batterica (0.25 ml/10 ml di terreno. Il ceppo test è auxotrofo per la VitB12



In Italia si usa *Escherichia coli 113/3*, che va mantenuto su terreni particolari indicati da F.U in modo che rimanga auxotrofo.



# TEST VITAMINA B12

Il terreno seminato si versa in una piastra Petri in modo da ottenere uno strato di 2.5-3 mm di spessore

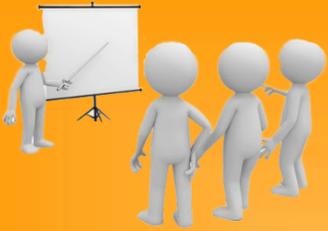
le soluzioni dello standard e del campione si dispongono sulla superficie dell'agar con l'aiuto di cilindretti di porcellana oppure si usano dischetti di carta da filtro sterilizzati ed imbevuti con le soluzioni, oppure praticare pozzetti sullo spessore dell'agar in cui deporre le soluzioni.

8 repliche per lo standard e 8 per ciascun campione da titolare.

Il metodo dei 4 punti → alone di crescita stimolato da

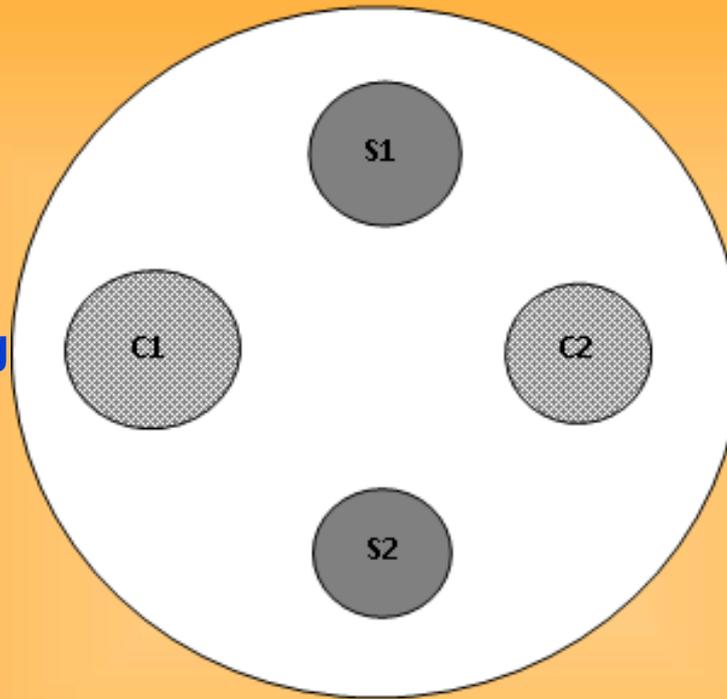
- cianocobalamina S1(0.1 mcg) e S2 (0.01 mcg)
- estratto di fegato C1 (0.1 mcg) e C2 (0.01 mcg)





# TEST VITAMINA B12

**S1 = standard 0.1 mcg**

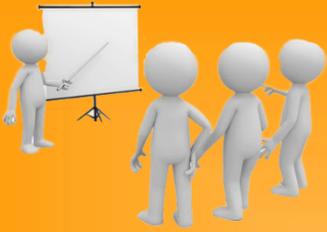


**C1 = campione 0.1 mcg**

**C2 = campione 0.01 mcg**

**S2 = standard 0.01 mcg**

**I punti S1-S2 C1-C2 dovranno essere disposti sulla piastra a quadrato e in modo alternato (S1-C1-S2-C2).**



# TEST VITAMINA B12



Incubazione per 18-24 h a 37°C.



Lettura misurare i diametri degli aloni di crescita confrontandoli con lo standard a concentrazione nota.

es:  $S_1 = 15\text{mm}$  il suo corrispondente  $C_1 = 21\text{mm}$ :

il campione contiene più VitB12

( $15: 0.1 \text{ mcg/ml} = 21: x$ ;  $x = 21 \times 0.1 / 15 = 0.14 \text{ mcg/ml}$  e quindi bisogna fare le dovute proporzioni per ottenere le giuste quantità)



*Per qualunque domanda o problema  
puoi contattarmi al*

- Tel: **3386428032**
- e-mail: [vivian.tullio@unito.it](mailto:vivian.tullio@unito.it)