



Life Sciences

**Metodologie di screening per il  
monitoraggio delle acque  
sotterranee.**

**La tecnica rapida  
di controllo  
Microbiologico  
di bioluminescenza**

***Dr.ssa Lucia Ceresa***

***European Marketing Manager***

***Rapid Microbiology***



Filtration. Separation. Solution. SM



# I metodi tradizionali vs. quelli rapidi

- **I metodi convenzionalmente adottati:**
  - conta in “**ufc**” (assumendo 1 cell = 1 ufc),
  - risultati tipicamente non prima di 3 - 7 giorni.
- **I metodi rapidi hanno dimostrato una sensibilità e un'accuratezza estremamente elevate. Sono risultati al confronto:**
  - spesso superiori (“objectionable organisms”)
  - in grado di rispondere all'esigenza di ottenere risultati accurati in tempi molto ristretti,
  - una reale alternativa ai metodi in uso,
  - un “nuovo” parametro e strumento di controllo oggi inesistente.



# Tecnologie di Microbiologia rapida

- La bioluminescenza è, fra le tecnologie rapide, quella in grado di fornire una valutazione immediata della contaminazione, analizzando la presenza di **ATP**, quale indicatore di un metabolismo cellulare attivo.
- La quantità di fotoni emessa dalla reazione enzimatica è direttamente **proporzionale** alla quantità di ATP presente nel campione e dunque **ai microrganismi**.



# Accettabilità del metodo

- **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**

**(20<sup>th</sup> edition – 1998) – Rapid detection Methods (9-22)**

- **9211 C.1 Bioluminescence Test (Total Viable Microbial Measurement)**

- **>The firefly luciferase test for ATP in living cells is based on the enzymatic reaction” <**

- **>For monitoring microbial populations in water, the ATP assay is limited primarily by the need to concentrate bacteria from the sample to achieve the minimum ATP sensitivity level, which is 10<sup>5</sup> cells/ml<**

- **>When combined with membrane filtration of 1L sample, ATP assay can provide the sensitivity level needed<**

# Le linee guida di riferimento

- PDA Technical Report 33  
'Evaluation and Implementation of New Microbiological Testing Methods - (June 2000)'



- USP Pharmacopoeial Forum Vol. 29  
(Jan.–Feb. 2003) <1223> IN-PROCESS REVISION  
'Validation of Alternative Microbiological Methods'



- Pharmedeuropa Vol. 16 n° 4  
(October 2004) <5.1.6.> 'Alternative Methods for control of Microbiological Quality'



# FDA approva la bioluminescenza

- Questo specifico protocollo di presenza/assenza sulla base della valutazione della **bioluminescenza** con il sistema Pallchek™, è stato approvato da parte dell'FDA su due diverse applicazioni:
  - **rilascio di un prodotto farmaceutico non-sterile,**
  - **monitoraggio dell'acqua (WFI).**
- L'utilizzo in routine della nuova tecnologia ha inoltre pienamente superato l'ispezione da parte delle autorità.

# Il sistema Pallchek™

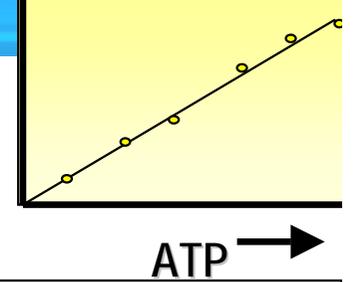
**Il sistema di Microbiologia Rapida Pallchek consiste in:**

- **KIT di REAGENTI:**
  - **Soluzione Extractant (pronta all'uso)**
  - **Reagente bioluminescente (enzima/subtrato) da attivare/ricostituire prima dell'uso**
  
- **Luminometro Pallchek che permette di QUANTIFICARE i fotoni emessi durante la reazione**



# Corrispondenza ATP $\longrightarrow$ RLU

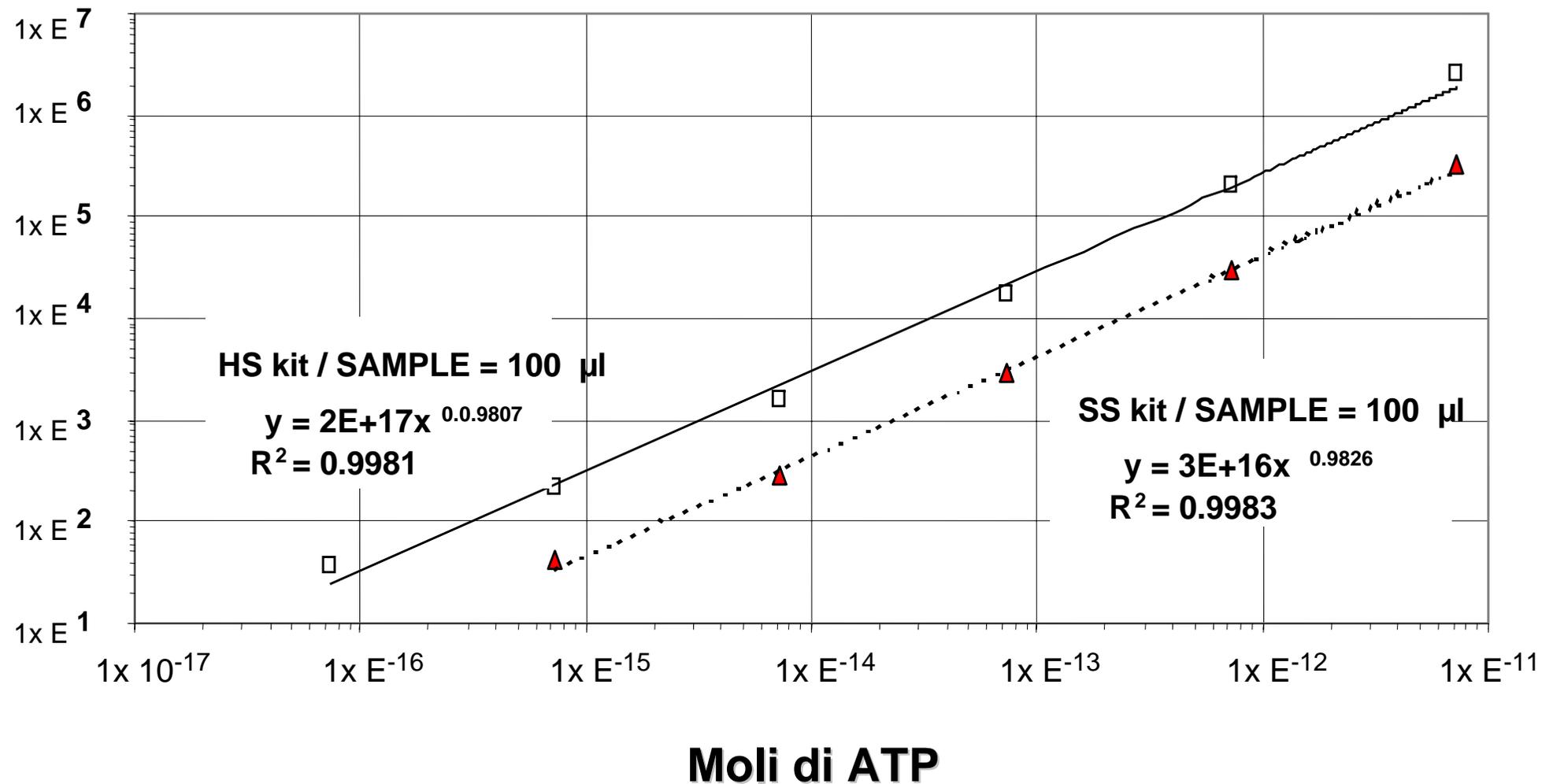
RLU  $\uparrow$



Diluizioni seriali 1:10 a partire da:  $7.25 \times 10^{-7} \text{M}$  di soluzione standard ATP

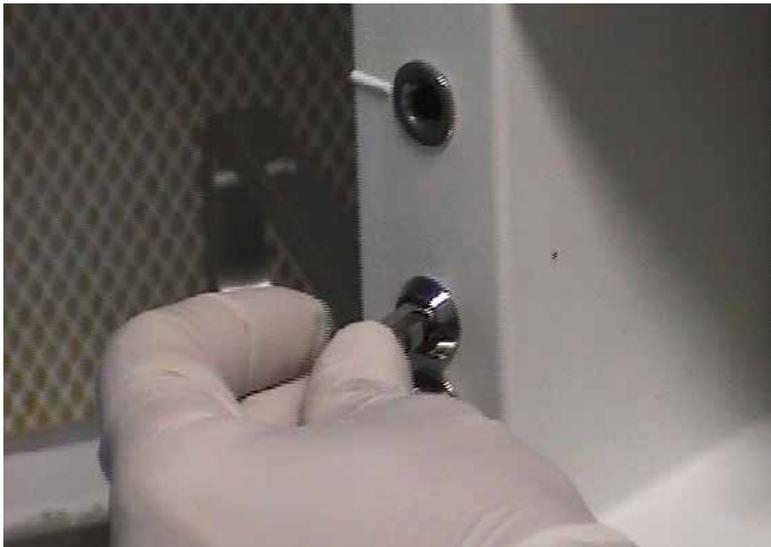
RLU's

■ HS kit    ▲ SS kit



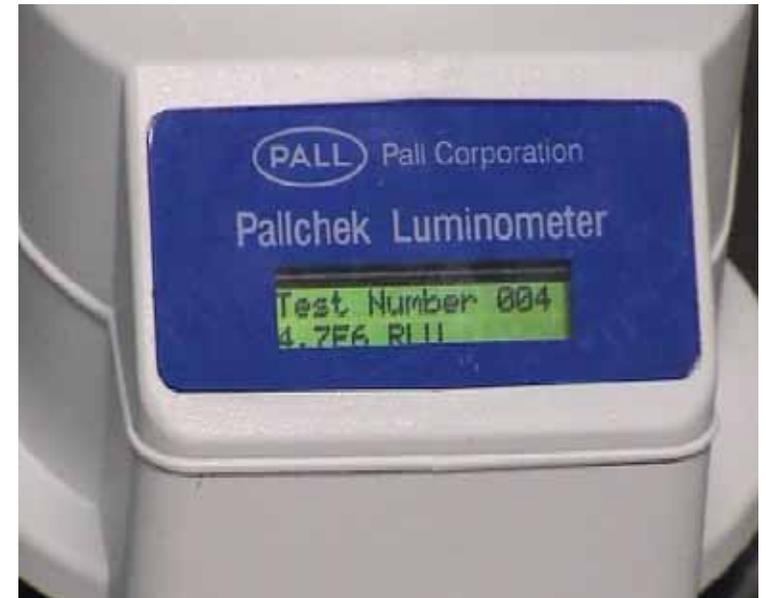
# Lo strumento

**Il luminometro Pallchek™ prodotto da Pall Corporation, utilizza un fotomoltiplicatore estremamente sensibile per misurare i fotoni emessi dalle reazioni di bioluminescenza**



**Lo strumento è dotato di una chiave di sicurezza per evitare qualsiasi manipolazione dei dati**

# La misurazione della luce



I risultati della lettura compaiono sul display dello strumento come **Relative Light Units (RLU)** e vengono anche simultaneamente stampati

# Pallchek™: reading cycle

## 1. Accensione dello strumento – Auto check

- <PALLCHEK v: 3.3>
- <Please Wait>
- <001: 4.5E2>
- **<READY TO COUNT>**



## 2 Lo strumento viene posto sulla piastra di lettura

## 3 Con una leggera pressione verso il basso viene attivato il vuoto

## 4 <Pumping> – controllo tenuta

## 5 <Checking> – controllo dell'assenza di interferenza di luce esterna

## 6 <Counting> – LETTURA (Bioluminescent reaction reading)

## 7 Visualizzazione risultato: <002 1.2E2>

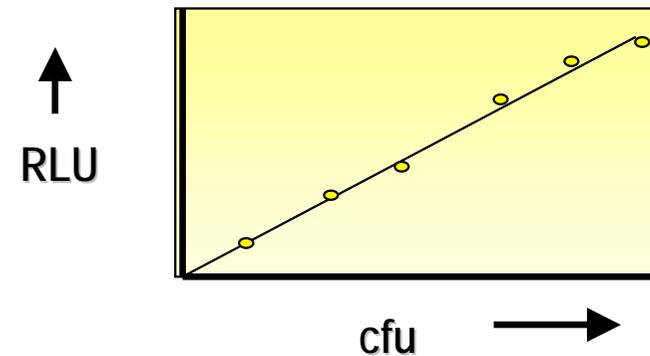
- <READY TO COUNT>

## 9 Rilascio del vuoto

- Tempo complessivo circa 20 secondi

# La bioluminescenza: applicazioni

- La valutazione dell' **ATP** può essere usata per valutare una contaminazione presente come “total bioburden” sia come metodo “*qualitativo*” sia come “*quantitativo*” ma non permette di risalire all' identificazione del contaminante



**Metodo quantitativo:**

**Risultati in 1 minuto**

# Metodo quantitativo: 1 minuto

**CAMPIONAMENTO**

Analisi del **CAMPIONE** tal quale  
o  
Concentrazione del **CAMPIONE** / MF

Filtrazione e massimo recupero su membrana

**ESTRAZIONE** dell'ATP (lisi cellulare)

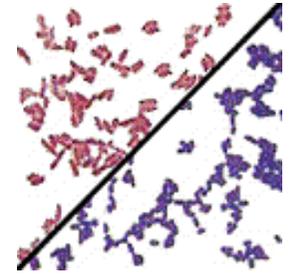
Reazione **ENZIMATICA** Luciferina/luciferasi

Misurazione strumentale dell'emissione **LUMINOSA** (RLU)

Valutazione **IMMEDIATA** della presenza di **ATP**

# Metodi analitici quantitativi

## ➤ Risultati immediati: in 1 minuto.



- campioni tal quali con circa  $> 10$  ufc.
- lettura immediata del campione, con tipiche applicazioni quali ad esempio:
  - Controllo e titolazione delle sospensioni microbiche
  - Controllo di materie prime
  - Validazione dell'attività antimicrobica (sanitizzanti)
  - Validazione dell'efficacia dei conservanti
  - Monitoraggio fermentazioni "in-process"
  - Tutti i tipi di acque, compresa la purificata
  - Monitoraggio ambientale e del personale

# Valutazione quantitativa sul tal quale



← Aggiunta del campione tal quale sul supporto



2. REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 1)

← Aggiunta del 1° reagente: 15 secondi

➤ **100**  $\mu\text{l}$  di extractant



3. REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 2)

← Aggiunta del 2° reagente: 5 secondi

➤ **100**  $\mu\text{l}$  di reagente bioluminescente



4. LETTURA del CAMPIONE BIOLUMINESCENTE

Rilevamento dell'ATP con lo strumento Pallchek

RISULTATO in 1 MINUTO

# Valutazione quantitativa su campione filtrato

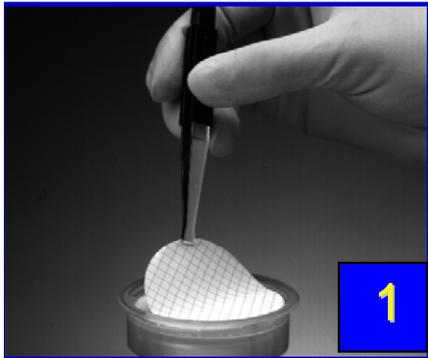
**A.** Preparazione dei campioni  
Concentrazione del campione su  
membrana.



**B.** LAVAGGIO MEMBRANA

# Lettura dell'ATP con Pallchek™

1. Trasferimento della membrana sul supporto di lettura



2. REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 1)

Aggiunta del 1° reagente: 15 secondi

➤ **150** µl di extractant



3. REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 2)

Aggiunta del 2° reagente: 5 secondi

➤ **100** µl di reagente bioluminescente



4. LETTURA del CAMPIONE BIOLUMINESCENTE

Rilevamento dell'ATP con lo strumento Pallchek

RISULTATO in 1 MINUTO





## **Punto 2 - REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 1)**

### **Rilascio di ATP**

La soluzione “**extractant**” aggiunta al campione agisce rapidamente con la componente fosfolipidica delle membrane cellulari dei microrganismi presenti:

- **I'ATP INTRACELLULARE è reso disponibile**



## Punto 3 - REAZIONE di BIOLUMINESCENZA - (fase 2)

### Reazione con ATP

L'enzima LUCIFERASI e il suo substrato LUCIFERINA (LH2):

- REAGISCONO immediatamente con l'**ATP** presente



# Punto 4 - LETTURA del CAMPIONE BIOLUMINESCENTE

## QUANTIFICAZIONE dell'emissione luminosa:

Il complesso luciferina (LH2) viene **ossidato** dall'enzima LUCIFERASI a ossiluciferina e si produce **luce**:



>>> **Counting** <<<

quantificazione accurata  
dei fotoni emessi

(**hv** = bioluminescenza 562 nm)



# Punto 4 – Quantificazione dell' ATP

## RISULTATO della lettura

<Test number            004>

<4.7E6            RLU>



L'emissione luminosa viene espressa come:

**Relative Light Units (RLU)**

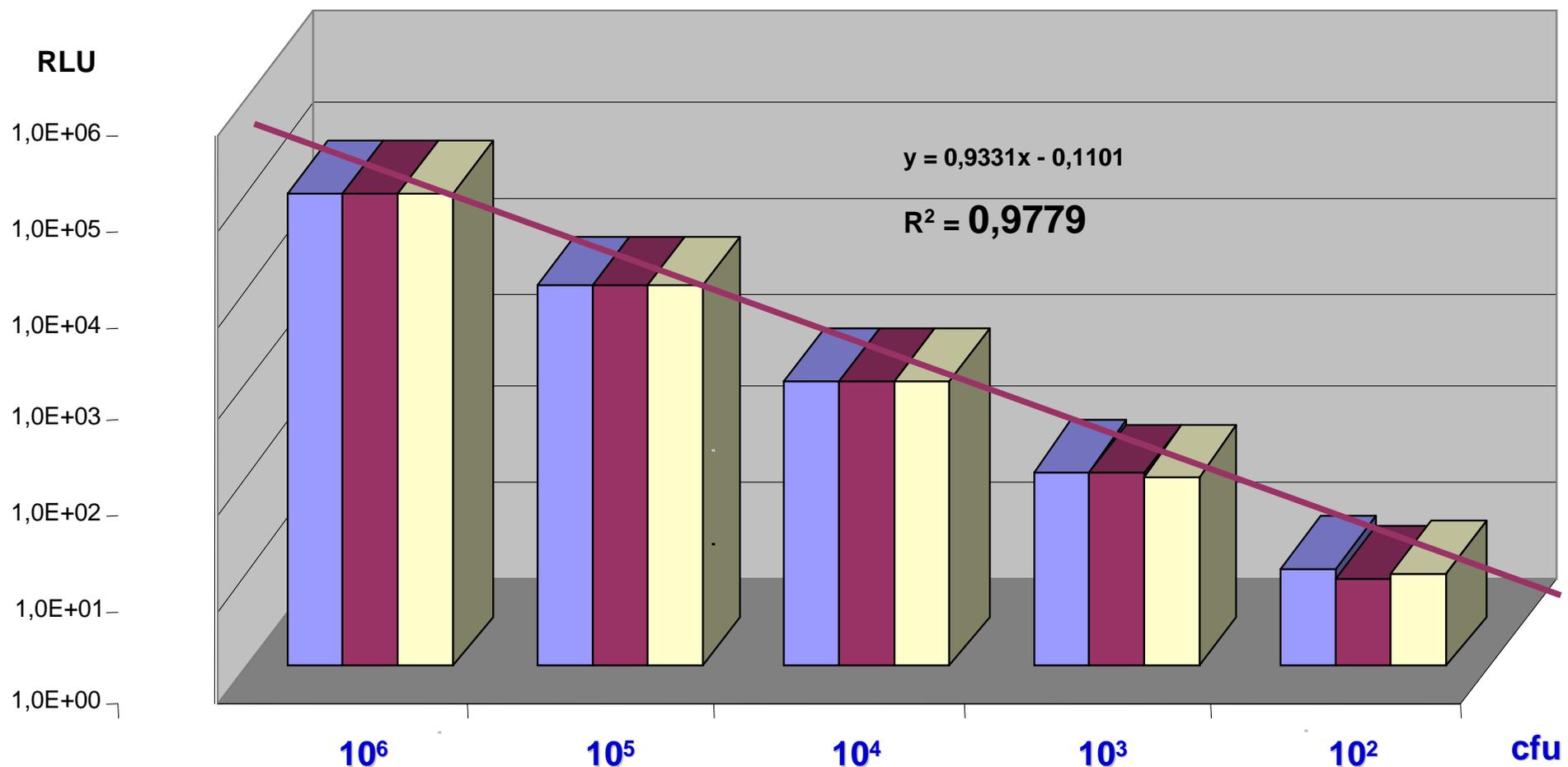
- Tempo complessivo di TEST: **20 secondi**

# Proporzionalità: ATP vs RLU e “ufc” vs. RLU

- Proporzionalità della rilevazione dell'ATP estremamente elevata.
- Analisi quantitativa, con valutazione immediata del campione

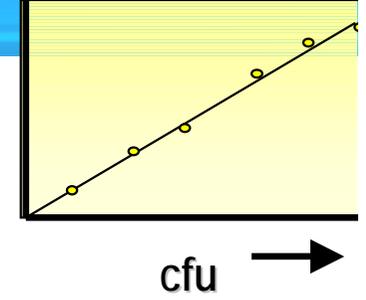
*Diluizioni seriali*

*A. niger (ATCC 16404)*



# CFU vs RLU

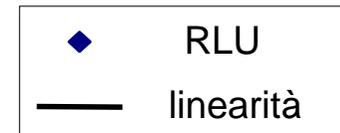
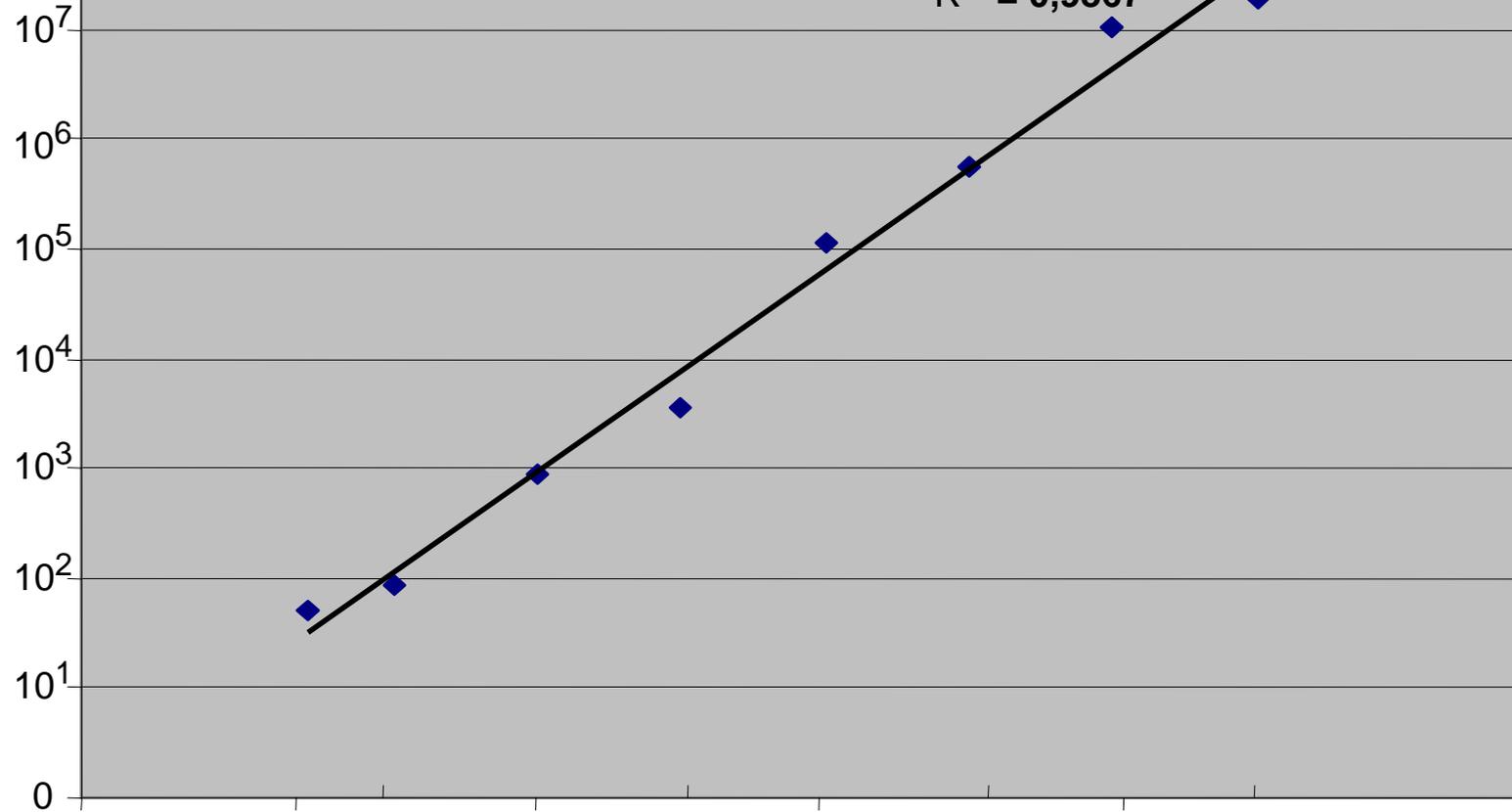
↑  
RLU



## B. diminuta CORRELAZIONE RLU vs.cfu

RLU

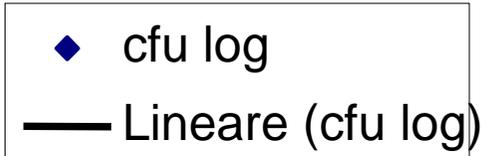
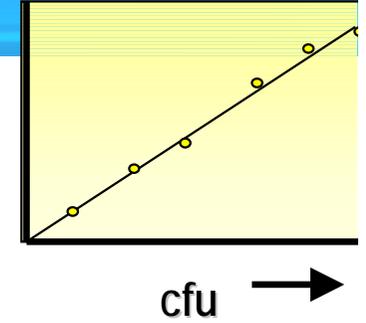
$$y = 0,9165x + 0,0734$$
$$R^2 = 0,9867$$



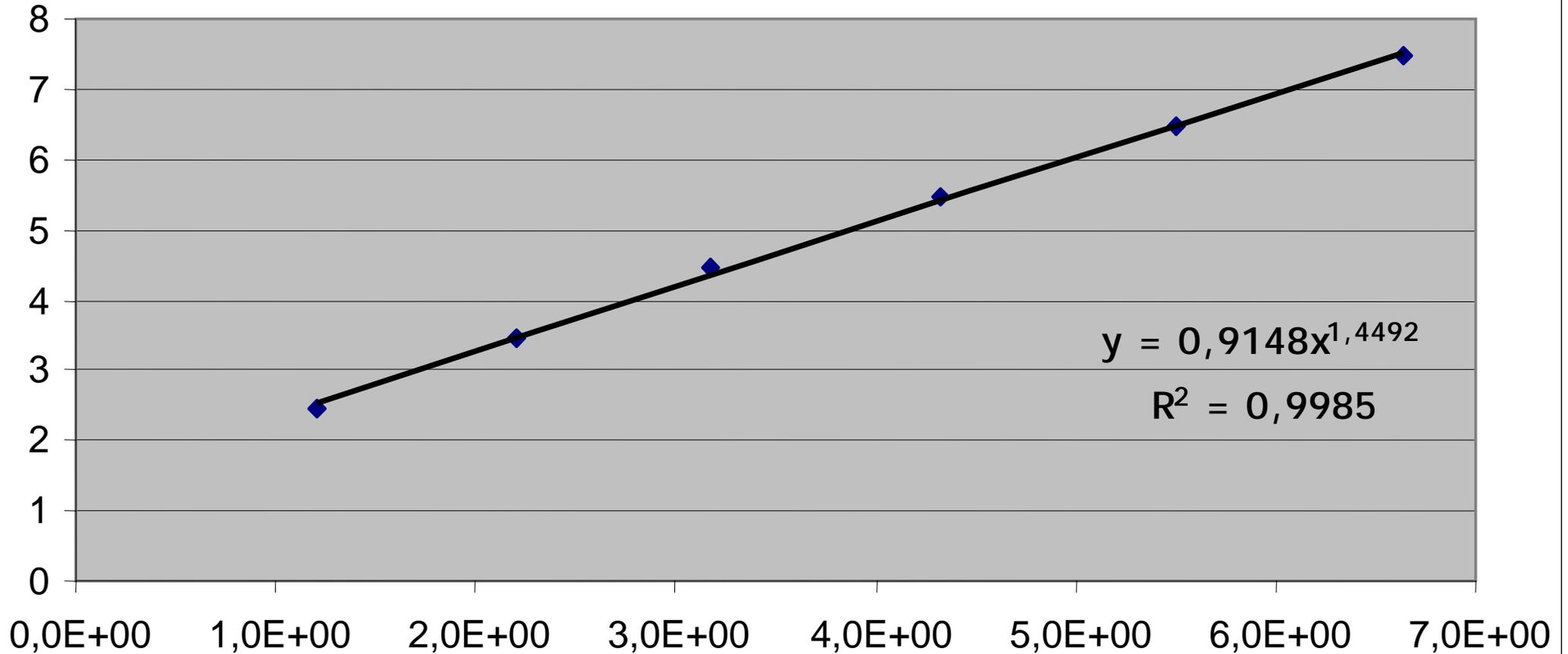
10<sup>1</sup> 10<sup>2</sup> 10<sup>3</sup> 10<sup>4</sup> 10<sup>5</sup> 10<sup>6</sup> 10<sup>7</sup> 10<sup>8</sup> cfu

# CFU vs RLU

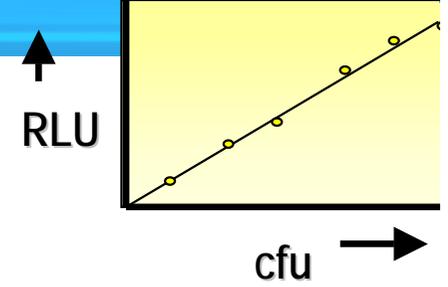
↑  
RLU



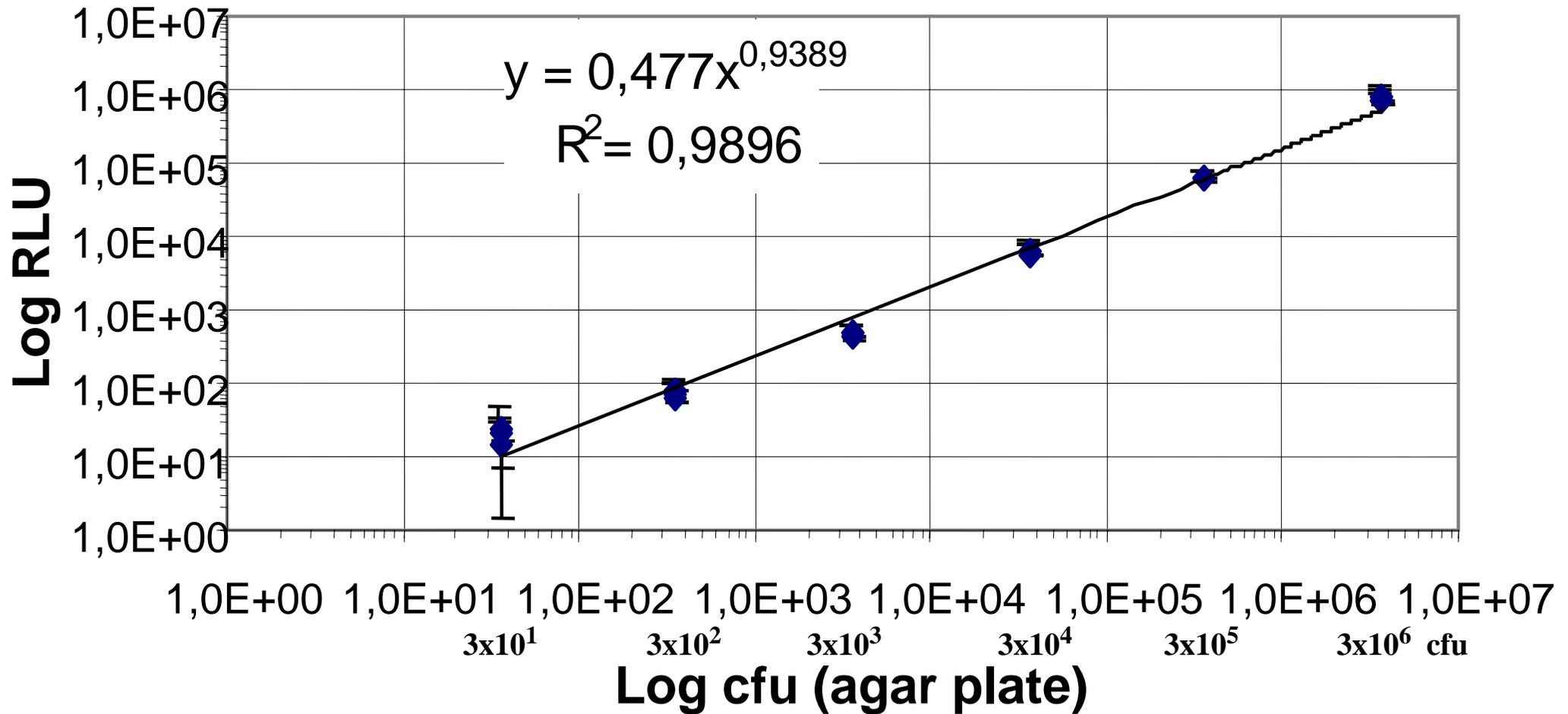
**S. aureus ATCC 6538 (1 ml)**



# CFU vs RLU

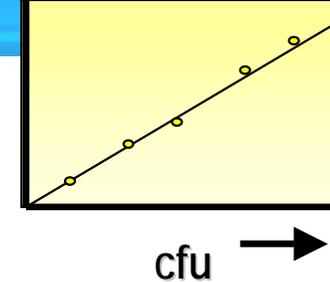


***P. aeruginosa* ATCC 14207**

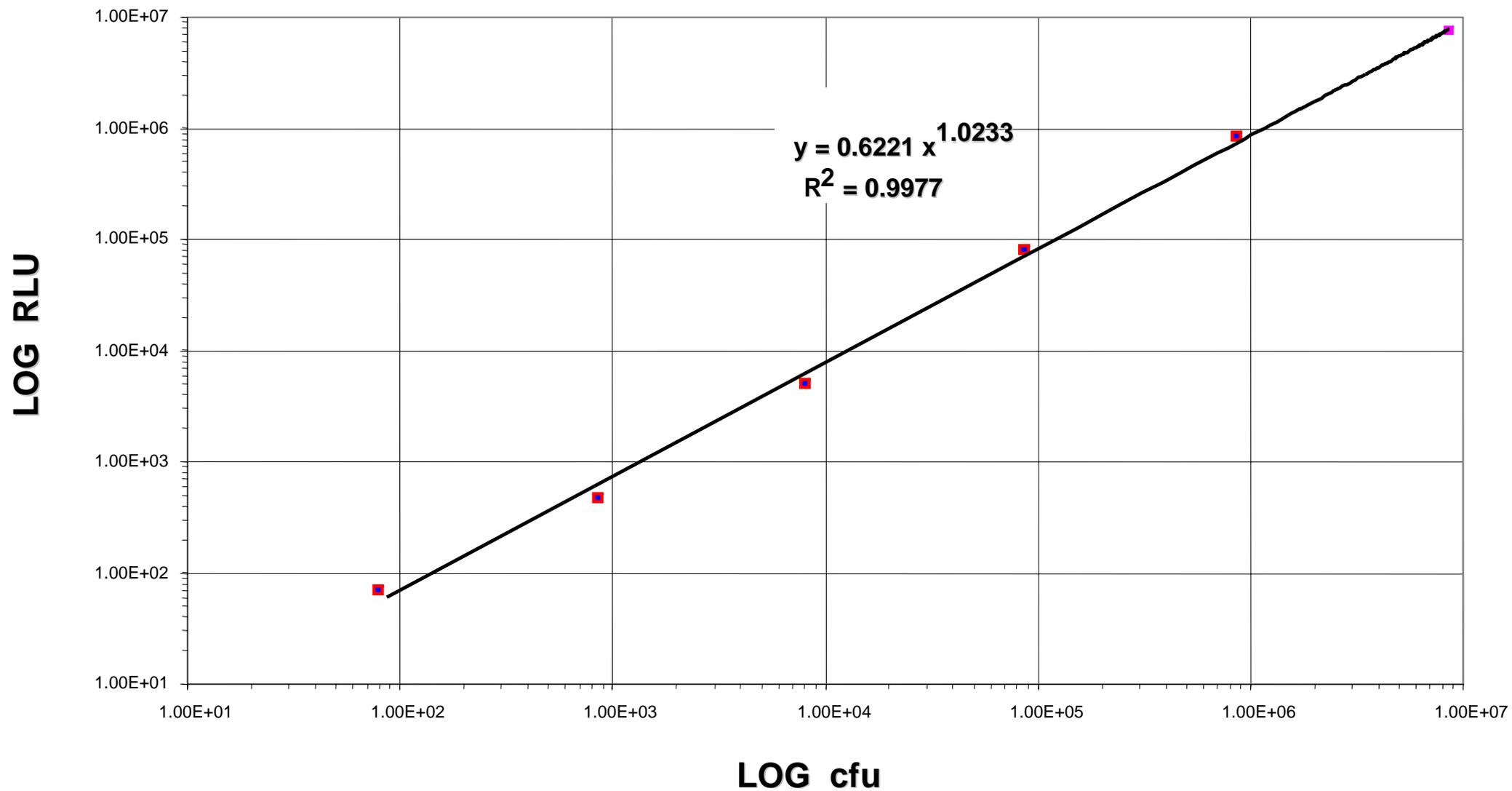


# CFU vs RLU

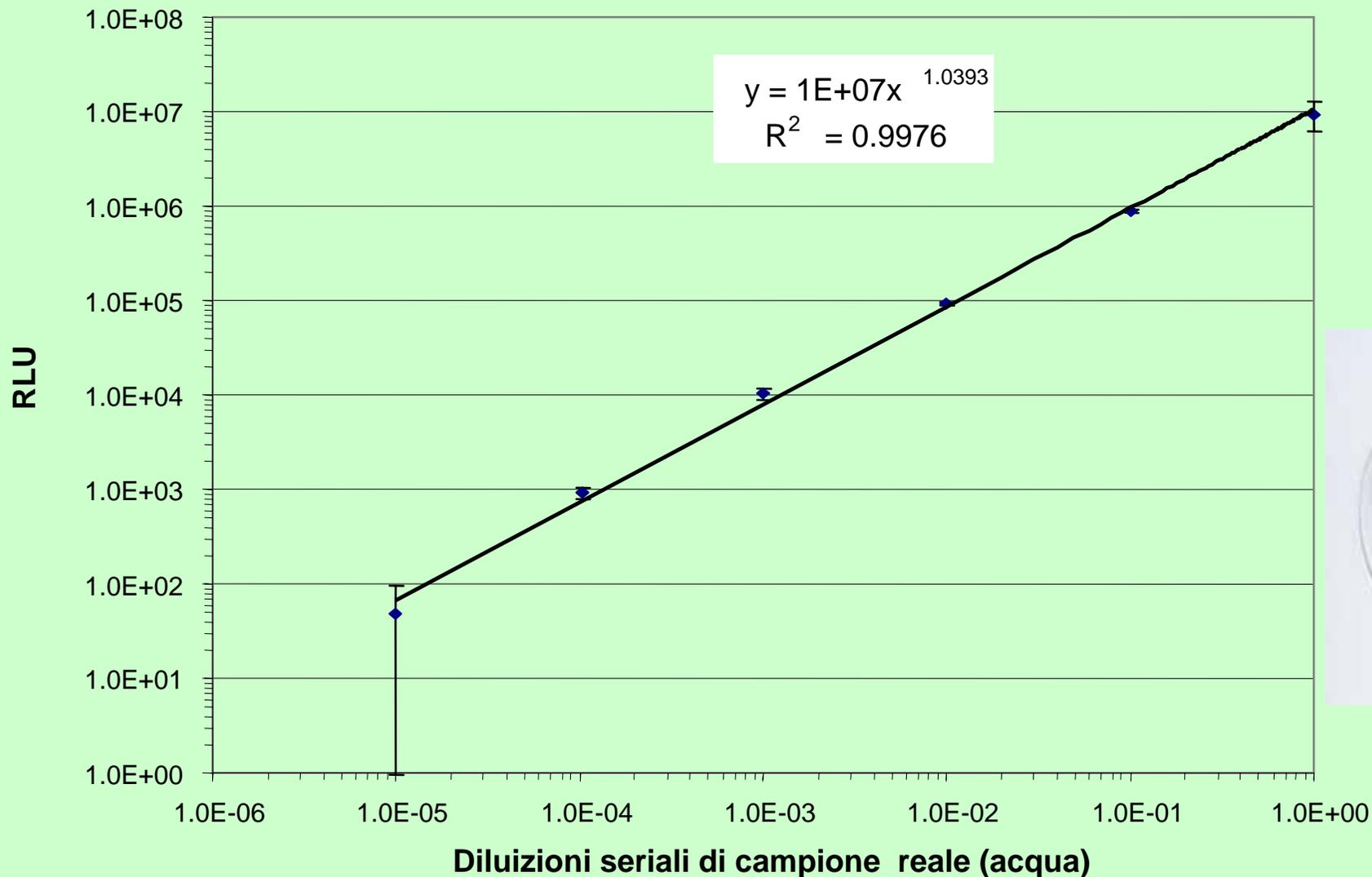
↑  
RLU



## E. coli (colture in PBS)



# Analisi di “conta totale” su acqua potabile



# Vantaggi della bioluminescenza

## Tradizionale conta in piastra

- Conta su AGAR:
- Risultato: in “ufc”
- Risultati: 3-7 giorni
  - TABC: 30-35°C (2-3 g)
  - TYMC: 20-25°C (5-7 g)
- Risultato soggettivo:  
lettura dell' **OPERATORE**
  - enumerazione dei micro organismi “coltivabili”  
come ufc:
    - MTL superato: <limite in ufc
    - MTL fallito: >limite in ufc

## BIOLUMINESCENZA

- Reazione enzimatica
- Risultato: in **RLU**
- Risultato: **1 minuto**
  
- Risultato obiettivo  
**STRUMENTALE:**
  - RLU dopo filtrazione su membrana:
    - Test superato: <soglia in **RLU**
    - Test fallito: >soglia in **RLU**

# **Metodo qualitativo: presenza/assenza**

**Risultati in 1 minuto dopo  
incubazione del campione  
per 16-24 ore**

Campionamento

- A) Concentrazione del CAMPIONE su membrana e inoculo in TSB
- B) Inoculo diretto campione non filtrabile in TSB
- C) Incubazione diretta del TAMPONE in TSB
- D) Filtrazione polimero o gel membrana x campioni ARIA e inoculo in TSB

Dopo 16-24 ore

CONCENTRAZIONE del campione (filtrazione 8ml di TSB) massimo recupero su membrana

2ml di TSB per IDENTIFICAZIONE

**ESTRAZIONE** dell'ATP (lisi cellulare)

Reazione **ENZIMATICA** Luciferina/luciferasi

Misurazione strumentale dell'emissione **LUMINOSA** (RLU)

Valutazione dell'**ATP** alla massima sensibilità (ufc=0)

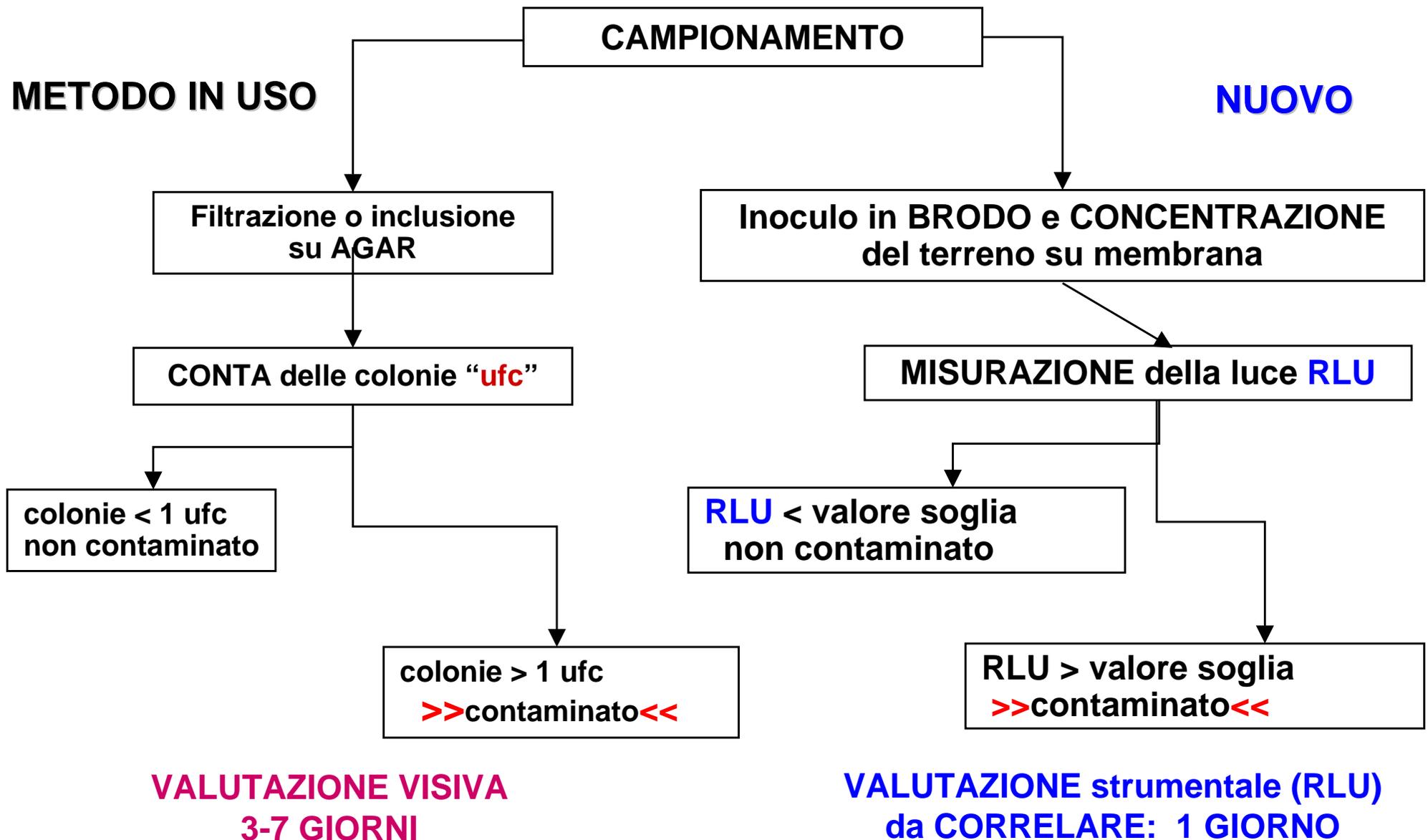
# Metodi analitici qualitativi

## ➤ Risultati dopo 16-24 ore

- campioni tipicamente con **0 ufc**
- arricchimento in TSB, previsto per ottenere un risultato inequivocabile, con tipiche applicazioni quali ad esempio:
  - “acque estremamente pulite”
  - WFI,
  - prodotti preservati e prodotti sterili,
  - efficacia sterilizzazione su Indicatori Biologici
  - efficacia cicli di sanitizzazione
  - monitoraggi ambientali aree sterili, **CRITICHE** e isolatori

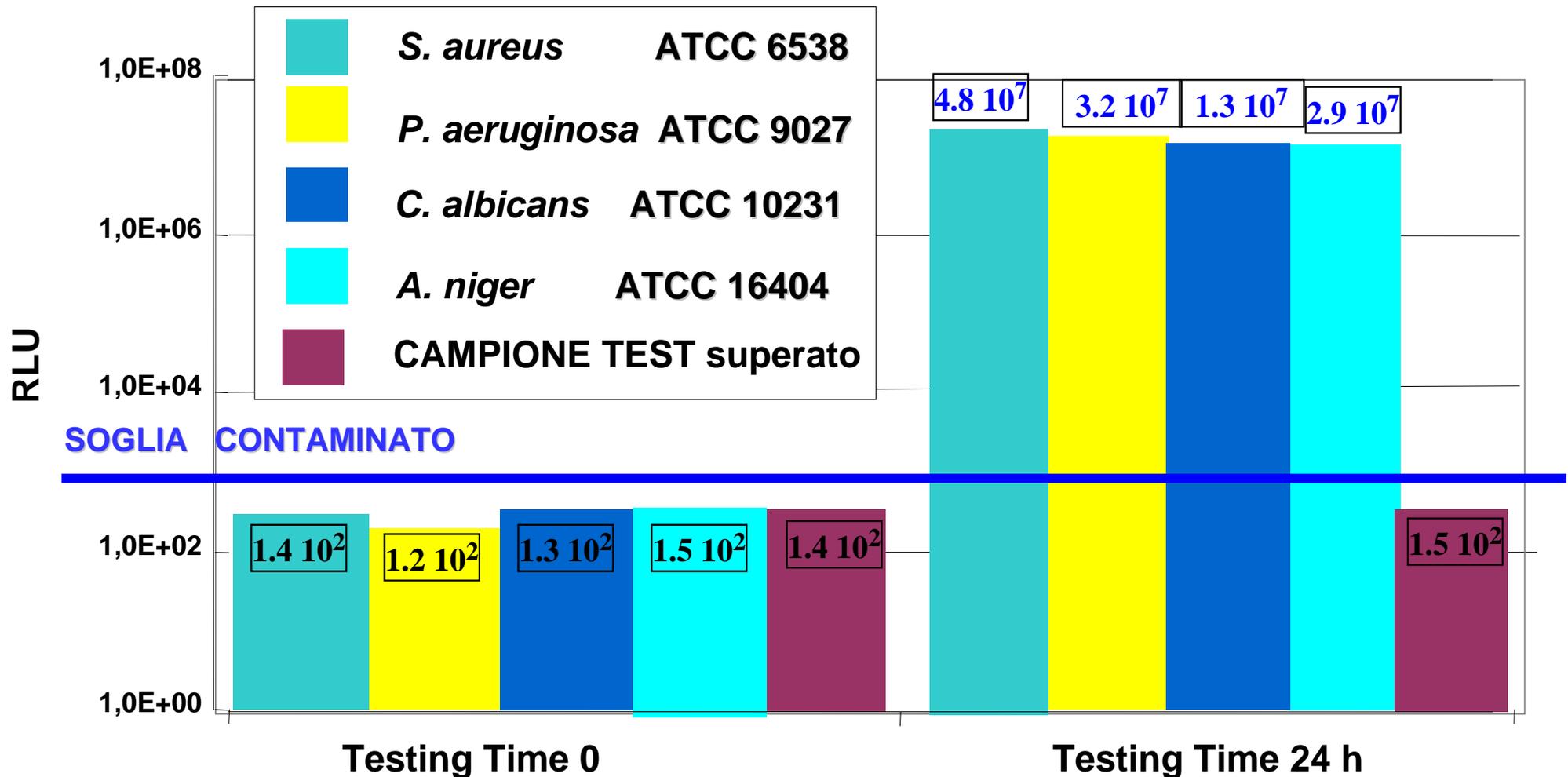


# Metodi a confronto: campioni critici



# Metodo di validazione vs routine

- Metodo di presenza/assenza: risultati < 24 ore
- Discriminazione evidente tra “assenza” e presenza.



# Validazione della specificità

## ATCC

### Gram -

- Escherichia coli ATCC 25922
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
- Ralstonia picketti ATCC 49129
- Salmonella abony NCTC 6017

### Gram +

- Micrococcus luteus ATCC 9341
- Staphylococcus aureus ATCC 6538
- Staphylococcus epidermidis ATCC 12228
- Bacillus subtilis ATCC 6633

### Sporigeni +

- Bacillus subtilis ATCC 6633

### Miceti:

#### LIEVITI:

- Candida albicans ATCC 10231

#### FILAMENTOSI - MUFFE:

- Aspergillus niger ATCC 16404
- Penicillium notatum ATCC 9179