ISBN 978-987-46701-4-4

Sección V.
Métodos de Control.

página

Capítulo V.1. **Ensayo de Esterilidad** **370**
Mónica Lagomarsino

Capítulo V.2. **Endotoxinas bacterianas** **384**
Beatriz Giampaolo y Nélida Mondelo

Capítulo V.3. **Control microbiológico de Medicamentos no obligatoriamente estériles** **415**
María Cristina Fernández

Capítulo V.4. **Verificación de la Aptitud de métodos microbiológicos** **435**
Sergio Iglesias

Capítulo V.5. **Valoraciones de Antibióticos por métodos microbiológicos** **454**
Mirta Franco

Capítulo V.6. **Valoración microbiológica de Vitaminas** **475**
Graciela Torno

Capítulo V.7. **Control microbiológico de Cosméticos** **483**
Esteban Zarankin

Capítulo V.8. **Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos** **491**
Luis Jiménez

Capítulo V.9. **Validación de métodos alternativos** **513**
Walter Mazzini y María Cristina Fernández

Capítulo V.1.

Ensayo de esterilidad

Mónica Lagomarsino

Introducción

Muestreo

Medios de cultivo

Soluciones de lavado y de dilución

Área de control de esterilidad

Método

Ensayos de aptitud del método

Equipos cerrados para el ensayo de esterilidad

Lectura e interpretación de resultados

Ensayo de esterilidad en aisladores

Introducción

El objetivo del ensayo de esterilidad es detectar la presencia de microorganismos que pueden estar presentes en los productos medicinales, biomédicos, sustancias u otro material que debe cumplir con el requisito de ser estériles.

El ensayo apareció por primera vez en la Farmacopea Británica del año 1932, y posteriormente se fue perfeccionando. En la Farmacopea de Estados Unidos (USP) XI se publicó el ensayo en el año 1936 para soluciones estériles, utilizando un medio líquido de peptona de carne e incubando el medio durante 7 días a 37 °C. Posteriormente la USP XII describió el ensayo para sólidos y líquidos estériles, mencionó la inactivación de algunos conservadores y el método investigaba la presencia de microorganismos aerobios y anaerobios. La USP XIII introdujo el uso del Caldo de Tioglicolato para detectar microorganismos aerobios, anaerobios y microaerófilos con un tiempo y temperatura de incubación de 7 días a 37 °C, y el Caldo Glucosado para detectar hongos y levaduras, incubando los medios de cultivo durante 15 días a 22 – 25 °C. Además esta farmacopea describía el área en la cual se debía desarrollar el ensayo. En la USP XIV, se modificó la temperatura de incubación del Caldo de Tioglicolato, la que pasó de 37 ºC a 32 – 35 °C, para favorecer el crecimiento de bacterias saprófitas no patógenas que podían estar presentes como contaminantes en los productos farmacéuticos. El Caldo Glucosado se cambió por el Caldo de Sabouraud, pero como en realidad no era conveniente que se utilizara un medio de cultivo selectivo para un control, luego se lo reemplazó por un caldo de 2 peptonas, que son los actuales digerido pancreático de caseína y digerido papaico de soja.

El ensayo tiene limitaciones que derivan de dos problemas insolubles: 1) La muestra siempre es inadecuada; y 2) La imposibilidad de los medios de cultivo de permitir el crecimiento de todos los microorganismos viables que puedan estar presentes en la muestra.

Según la bibliografía, **esterilidad** es el estado libre de microorganismos vivos de todo tipo. Este concepto no se puede demostrar experimentalmente, y por lo tanto es esencialmente el resultado de una operación estadística. Es imposible afirmar la esterilidad de una partida o lote, a menos que se controlen una por una todas las unidades.

Muestreo

Las farmacopeas indican un tamaño de muestra a tomar que depende del tamaño del lote elaborado, sin embargo no es suficiente para demostrar la esterilidad de todo el lote, lo cual se demuestra por el cálculo de probabilidad de muestreo de al menos una unidad contaminada, que responde a la siguiente fórmula:

$$P = 1 - (1 - c)^N$$

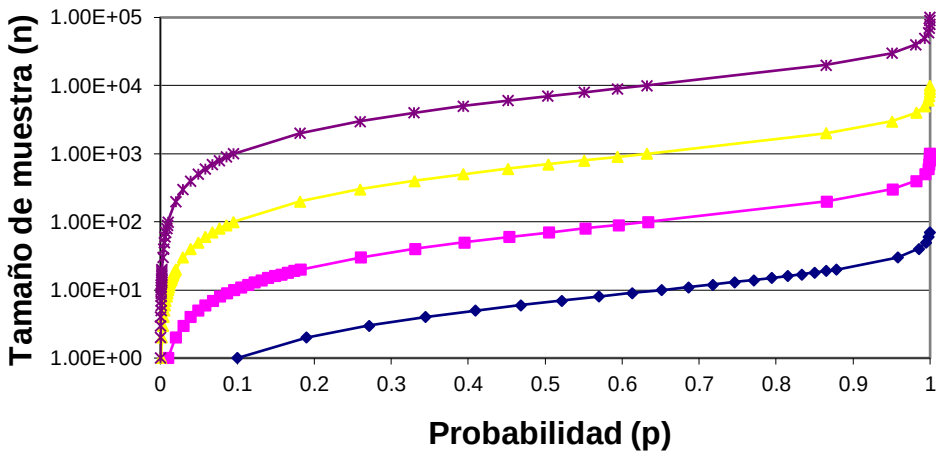
donde: N = número de unidades muestreadas
c = % de unidades contaminadas / 100

De acuerdo con esta fórmula, cuando la muestra es de 20 unidades, si el 0.1% de unidades están contaminadas, la probabilidad de tomar una unidad contaminada en la muestra es P=0.02, o sea sólo el 2% de las posibles muestras va a arrojar un resultado positivo.

Esta probabilidad no aumenta demasiado cuando el tamaño de la muestra es mayor, por ejemplo, para una muestra de 40 unidades, la probabilidad de muestrear al menos una unidad contaminada es sólo 0.04. Esto demuestra que el incremento de N no es suficiente para detectar una contaminación.

Si la contaminación es muy alta, por ejemplo el 1% de las unidades, con una muestra de 20 unidades, P = 0.18; y si tuviese lotes con una contaminación de 5%, el 46% de ellos serían aprobados. En la Figura 1 puede visualizarse la dificultad del muestreo.

Figura1: *Tamaño de muestra vs. Probabilidad de muestrear al menos una unidad contaminada en lotes con 10% de unidades contaminadas (línea azul), 1% de unidades contaminadas (rosa), 0.1% de unidades contaminadas (amarillo) y 0.01% (violeta)*



Por esa razón se concluye que en la manufactura de un producto estéril se deben tomar todas las precauciones necesarias para asegurar la esterilidad del mismo.

En el ensayo de esterilidad deben incluirse no sólo muestras representativas de todo el lote sino también muestras tomadas de las partes del lote más expuestas al riesgo de contaminación, como ser:

- Productos envasados en asepsia: Muestras de envases llenados al inicio y al final de cada ciclo de llenado y luego de alguna interrupción del trabajo.
- Productos esterilizados en su envase final: Muestras de la parte potencialmente más fría de la carga de cada ciclo de autoclave.

Además en el muestreo deben tenerse en cuenta los sublotes, que son por ejemplo los diferentes días de un proceso de llenado aséptico: y para productos con esterilización terminal, cada carga de esterilización. Hay otros posibles casos de sublotes, que dependen de la evaluación del laboratorio. En todos esos casos la muestra debe tomarse por separado y el ensayo de esterilidad debe realizarse con cada una de ellas, con el número de unidades muestreadas como si fuese un lote completo.

También puede ser necesario el muestreo de graneles, o de las primeras unidades llenas cuando se sospeche algún problema de ensamble o conexiones en el área aséptica, aunque esas muestras no sean analizadas rutinariamente, pero pueden ser útiles cuando una muestra da positiva, como parte de la investigación a realizar sobre la causa del resultado del ensayo.

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo empleados en este ensayo son el Medio fluido de Tioglicolato (FTM) y el Caldo de peptonas de soja y caseína (TSB). Se debe controlar la fertilidad de cada lote de medio para determinar la posibilidad de detectar una contaminación baja (Test de Promoción de crecimiento o GPT). Además se debe confirmar la esterilidad en una porción del mismo.
Los medios de cultivo pueden prepararse en el laboratorio, o pueden emplearse mezclas deshidratadas comerciales de fórmulas similares que, después de reconstituidas siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante, cumplan con el GPT. También pueden adquirirse medios preparados listos para usar. La composición y el proceso de fabricación y esterilización de los medios de cultivo se describen en las farmacopeas [1,2,3].

Usar el FTM para incubación en condiciones aeróbicas a una temperatura de 30 - 35 ºC, y el TSB para la incubación en condiciones aeróbicas a 20 – 25 °C. Para productos que contengan sustancias mercuriales puede usarse FTM como reemplazo del TSB, incubándolo a 20 - 25 ºC. Es posible usar Caldo Tioglicolato, que no contiene agar ni resazurina, como medio alternativo.

Incubar todos los medios durante 14 días, y observar a intervalos regulares. Por lo general la observación se realiza diariamente.

- ***Esterilidad de los medios de cultivo***

  Confirmar la esterilidad de cada lote de medio de cultivo, a través de la incubación de al menos una porción del lote a la temperatura especificada para dicho medio y durante no menos de 14 días.

- ***Prueba de promoción del crecimiento (GPT)***

  Se debe examinar cada carga esterilizada de cada lote de medio de cultivo para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano, a través de la inoculación por duplicado, en envases separados de cada medio, de menos de 100 UFC de cada una de las cepas descriptas en las farmacopeas [1,2,3], e incubando en las condiciones especificadas para cada medio de cultivo.

  Los medios de cultivo son adecuados si existen evidencias de crecimiento en todos los envases inoculados dentro de los 3 días de incubación para bacterias y 5 días de incubación para hongos. Los medios no se consideran aptos si no hay crecimiento microbiano correspondiente al microorganismo inoculado.

  Las cepas de control utilizadas deben mantenerse con procedimientos adecuados y se deben utilizar con no más de 5 pasajes a partir de la cepa patrón.

- ***Almacenamiento***

  Los medios preparados que han sido almacenados en envases no perfectamente sellados pueden ser usados por el término de un mes o el tiempo de vigencia que haya sido validado. Los medios comprados listos para usar, almacenados en envases adecuadamente sellados, pueden ser usados por un plazo que no sobrepase el año, pero se deben llevar a cabo las pruebas de promoción del crecimiento cada tres meses.

- ***Medios de cultivo para penicilinas y cefalosporinas***

  Para realizar el ensayo de esterilidad de penicilinas o cefalosporinas, la USP indica transferir en forma aséptica a cada medio, una cantidad de penicilinasa suficiente para inactivar la cantidad de antibiótico presente en la muestra. Se determina la cantidad apropiada de penicilinasa a usar para este propósito utilizando una preparación de penicilinasa cuya actividad haya sido determinada previamente, o confirmando que la cantidad de penicilinasa transferida es la apropiada efectuando el Ensayo de validación para bacteriostasis y fungistasis, inoculando menos de 100 unidades formadoras de colonias (ufc) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y observando desarrollo microbiano típico.

  Cuando el ensayo se realiza por filtración, es necesario el uso de membranas de borde hidrófobo cuando se aplicará el método tradicional, o membranas de bajo "*binding*" cuando se utilizan equipos para métodos

cerrados. En cualquiera de estos casos la Penicilinasa puede ser agregada también al último enjuague o dejando la solución en contacto con la membrana durante un tiempo que debe ser validado.

Soluciones de Lavado y de Dilución

Cuando es necesario diluir un líquido, o siempre para polvos o sólidos filtrables, se utiliza Solución A, o Peptona de carne 0,1%, según se describe en las farmacopeas [1,2,3].

Cuando la muestra es oleosa, se puede agregar Polisorbato a la Solución A (1 ml por litro o la concentración validada). Esta solución también puede emplearse cuando la validación del ensayo requiera el agregado de Polisorbato como antagonista de alguna sustancia antimicrobiana presente en el producto.

Cuando se utiliza el método por filtración, puede ser posible no utilizar soluciones de dilución cuando el producto es líquido y filtrable, y cuando la aptitud del método demuestre que dicho procedimiento es apto para el desarrollo de los microorganismos. Eso ocurre para Agua Destilada, Solventes que no contienen sustancias antimicrobianas y Soluciones salinas. Para otros productos debe demostrarse.

Las soluciones de lavado y de dilución no deben presentar propiedades antimicrobianas, o propiedades tóxicas frente a los microorganismos que se utilizan para realizar los ensayos de aptitud para lo cual se debe demostrar una recuperación de más del 70% de los microorganismos inoculados.

Área de control de esterilidad

A continuación se describe el área para realizar test de esterilidad en cabina de flujo laminar. Más adelante se describen las condiciones para el uso de aislador para realizar el ensayo.

El área de control debe estar construida con materiales fácilmente lavables y sanitizables, poseer vestuarios, esclusa para materiales, presión positiva y aire filtrado por HEPA para mantener el ambiente controlado en cuanto a partículas y presión, regulando la dirección de las corrientes del aire. Se pueden utilizar sustancias germicidas y lámparas de UV previo al ensayo. Todas las superficies (paredes, pisos, mesadas, muebles) y utensilios deben estar limpios y desinfectados con una solución germicida y los materiales que estén en contacto con las muestras y el procedimiento de ensayo deben estar esterilizados.

- ***Monitoreo microbiológico del ambiente:***

  Se debe monitorear microbiológicamente las superficies y el aire, así como el personal involucrado en los ensayos. La calidad microbiológica del aire y superficies debe ser al menos equivalente a la de las áreas de producción de estos productos.

  Para el monitoreo del aire se pueden utilizar métodos activos o placas de sedimentación, aunque en una cabina de flujo laminar trabajando, el uso de muestreadores activos puede no ser apropiado.

  Durante la realización de los ensayos de esterilidad en cabinas de flujo laminar, donde las manos realizan tareas críticas, el monitoreo de los guantes es importante.

  Las superficies que deberían ser muestreadas con alguna frecuencia predeterminada son la mesada de trabajo, la balanza si existiera, el teléfono del sector, la mesada auxiliar de trabajo, y las rejillas de los retornos.

  Es importante controlar la presión diferencial del cuarto y del equipo de flujo laminar, así como también realizar controles periódicos de velocidad del aire y ausencia de fugas.

- ***Personal:***

  Cuando el ensayo de esterilidad se realiza en un área con cabina de flujo laminar, los operadores deben estar equipados con ropas adecuadas y estériles, similares a las utilizadas en áreas de trabajo aséptico. El personal que realice el ensayo debe poseer suficiente experiencia, y la interpretación de los resultados deberá hacerlo una persona con estudios de microbiología o se haya adiestrado en ello. Durante el ensayo deben desinfectarse las manos enguantadas regularmente, no deben realizar movimientos bruscos, ni realizar el ensayo impidiendo el libre flujo de aire de la cabina de flujo laminar.

Si se utiliza el método tradicional de corte de la membrana, considerar que la etapa de cortar la membrana y colocar cada mitad en el medio correspondiente, es el momento crítico de la operación, debido al manipuleo que puede facilitar la contaminación. Además si se utiliza este método es aconsejable esterilizar el equipo de filtración con la membrana colocada, para disminuir el riesgo por manipuleo.

Si se utiliza en una cabina de flujo laminar un equipo cerrado, Steritest o similar, se minimiza el riesgo de contaminación.

Métodos

Existen dos métodos para realizar este ensayo, el de *Transferencia Directa* y el de *Filtración por membrana*. En lo posible, el método de elección para el ensayo de esterilidad es el de Filtración por membrana.

El método a emplear debe ser simple, eficiente, reproducible, que pueda ser posible analizar un gran número de unidades, que permita el crecimiento de la mayoría de los microorganismos y que sea de bajo costo.

El número de unidades que se deben someter al ensayo y la cantidad de muestra mínima de cada unidad que se debe ensayar por medio de cultivo, y el volumen mínimo de cada medio de cultivo, se describen en las farmacopeas [1,2,3].

Antes de comenzar el ensayo se deben identificar las muestras, desinfectar la superficie exterior de los envases con un agente descontaminante adecuado sumergiéndolas en un recipiente con la solución del agente. El comúnmente usado es Etanol 70% por no dejar residuos y por ser de fácil secado. Es importante recordar que el etanol no tiene acción esporicida. De acuerdo a la experiencia de la autora, el procedimiento más apropiado es sumergir las muestras al menos durante 20 minutos en Etanol 70% no filtrado, ingresar así las muestras dentro de esta solución al área de control, y allí transferirlas a un recipiente con Etanol 70% filtrado, esperando 20 minutos adicionales para realizar el ensayo.

Todos los envases deben abrirse siguiendo técnicas asépticas. En caso de apertura de ampollas cuando se utilizan equipos cerrados de control (Steritest o similar), estos cuentan con abreampollas que deben esterilizarse por autoclave. Cuando el producto está en viales estos equipos cuentan con agujas para cada tipo de producto y de vial.

Se deben incubar controles negativos, juntamente con los frascos o tubos o canisters sembrados con las muestras. Para realizarlos, se debe seguir el método de control, incluso los lavados, pero sin la muestra. Cuando la muestra es un liofilizado en el cual se agrega diluyente para reconstituir, conviene filtrar el resto de diluyente. Estos controles negativos son fundamentales porque si el control negativo y la muestra presentan desarrollo microbiano, es la única manera que el resultado del ensayo puede anularse y entonces el test puede repetirse de la misma manera que el ensayo original. Se lo considera “error de laboratorio” (ver capítulo de Investigación de desviación de resultados microbiológicos en este manual).

A continuación se describen los métodos:

1. Método de transferencia directa

Se utiliza para:

- Líquidos no filtrables
- Líquidos oleosos
- Semisólidos (cremas, ungüentos)
- Sólidos no filtrables (que no se pueden disolver o suspender)
- Algodón purificado, gasa, apósitos quirúrgicos, material para suturas y productos relacionados.
- Dispositivos médicos esterilizados.
- Jeringas estériles vacías

Cuando el producto no puede ser filtrado de ninguna manera, ni aún en un diluyente adecuado, el método a utilizar es el de Transferencia directa, que consiste en la transferencia de la cantidad de producto que se indica en las farmacopeas, en un volumen de medio de cultivo que debe ser determinado en los ensayos de aptitud.

Se inocula o agrega la muestra directamente en ambos medios de cultivo tal que el volumen de la muestra no sea mayor al 10% del volumen del medio de cultivo. Se considera que el mayor volumen de medio a emplear es de 1 litro. Si no fuese suficiente parala totalidad de la muestra, más de un recipiente deberán utilizarse.

Si el producto a ser ensayado posee actividad antimicrobiana, se puede llevar a cabo, colocando en el medio de cultivo un agente neutralizante o diluyendo en una cantidad suficiente de medio de cultivo. Esos cambios deben ser validados.

2. Método de Filtración por Membrana

Se utiliza para:

- Líquidos miscibles en vehículos acuosos
- Líquidos inmiscibles en vehículos acuosos
- Sólidos filtrables
- Aceites y soluciones oleosas
- Semisólidos
- Aerosoles estériles
- Dispositivos biomédicos esterilizados
- Jeringas prellenadas y vacías

El método consiste en la filtración en una unidad filtrante a través de una membrana de 0.45µm de poro del producto o de una solución verdadera del mismo en un diluyente apropiado y el posterior lavado de la membrana con una solución que por lo general es la misma que el diluyente. Las membranas o las medias membranas se introducen en sendos medios de cultivo, o en el caso de utilizar sistemas cerrados los medios de cultivo se introducen en los canisters. (Figuras 2, 3 y 4).

Figura 2. *Fotografía Cortesía de MerckMillipore*

Figura 3. *Fotografía Cortesía de MerckMillipore*

Figura 4. *Fotografía Cortesía de MerckMillipore*

Una membrana adecuada para las pruebas de esterilidad posee un tamaño de poro de 0,45 µm, un diámetro aproximado de 47 - 50 mm, y tiene un borde hidrofóbico o de baja retención de producto para minimizar la inhibición microbiana de los residuos que puedan quedar retenidos en la membrana. Si el producto no tiene sustancias inhibidoras puede usarse una membrana sin borde hidrofóbico, pero debe humedecerse antes de agregar la solución con el producto. Las membranas de nitrato de celulosa se usan para líquidos acuosos, aceites, y soluciones acuosas débiles; las membranas de acetato de celulosa, por ejemplo, se usan para soluciones alcohólicas fuertes. Hay membranas filtrantes especialmente adaptadas para ciertos productos como por ejemplo antibióticos. En equipos a ser esterilizados en el laboratorio, es conveniente que la unidad entera sea montada y esterilizada con la membrana colocada antes de su uso, ya que de esa forma el manipuleo durante el ensayo se minimiza. Cuando el producto o material a ser ensayado es oleoso, la membrana debe estar completamente seca antes de efectuar la prueba.

Se ha demostrado que el tamaño de poro de 0,45 µm es el más conveniente para la recuperación microbiana luego de la filtración [17].

Ensayos de Aptitud del Método

Antes de efectuar por primera vez un ensayo de esterilidad de un producto o material, se debe demostrar que el producto no tiene actividad bacteriostática ni fungistática. Estos ensayos se deben repetir cada vez que se cambia alguna condición de la prueba o la composición del producto.

Para realizar el ensayo de aptitud del método de filtración por membrana, el inóculo de menos de 100 UFC de las cepas de control [1,2,3] descriptas en las farmacopeas, se agrega en el último lavado, y la turbidez presentada por el desarrollo microbiano en el medio de cultivo luego de su incubación durante un período de no más de 5 días, debe ser equivalente a la que se obtiene por la filtración del diluyente inoculado, en contacto con el medio de cultivo correspondiente (control positivo). Si el desarrollo microbiano del medio de cultivo con producto no es visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. En ese caso el ensayo debe repetirse aumentando el número de lavados o su volumen, o cambiando el tipo de membrana, o aumentando el volumen de medio de cultivo, o usando un agente neutralizante como polisorbato 80, lecitina, penicilinasa o solución de Mg^{++} entre otros. Se considera que se puede probar hasta 5 lavados de 200 ml cada uno. Se considera un volumen máximo de medio de cultivo por recipiente de 1 litro.

Para considerar que un procedimiento está validado, debe realizarse este ensayo por triplicado y de manera independiente. Pero además debe demostrarse la efectividad del ensayo y la ausencia de toxicidad de diluyentes y soluciones de lavado cuando se ha agregado un antagonista o cuando se ha modificado la solución.

Equipos cerrados para el ensayo de esterilidad

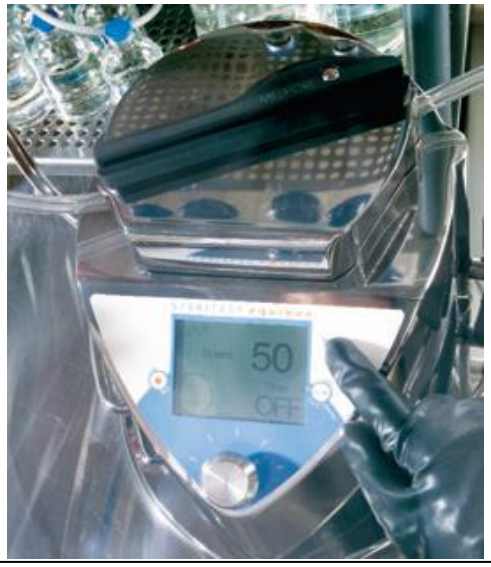
Los falsos positivos y negativos, fallas del equipo y los errores humanos durante la realización del ensayo de esterilidad pueden costar tiempo, dinero, y hasta el retiro del mercado del producto farmacéutico. Por eso es importante reducir los falsos positivos, para poder asegurar que un positivo es un producto contaminado.

El método de filtración a través de membrana en vaso y embudo abierto (Figuras 2 y 3) es un método susceptible a errores por manipulación o contaminación en los procesos de filtración de la muestra, enjuague y transferencia de la membrana al medio de cultivo, y el corte de la misma. Para reducir estos falsos positivos se diseñaron sistemas más cerrados y automatizados.[4]

Estos sistemas constan de una bomba peristáltica controlada por un software que se utiliza para la transferencia segura y uniforme de muestras de productos farmacéuticos estériles, en sus diferentes presentaciones y tipos de envase, a las unidades de filtración [5]. La bomba y las unidades (*canisters*) ofrecen fiabilidad y uniformidad para el ensayo de esterilidad. Los equipos más modernos basados en esta tecnología permiten desde una computadora desarrollar procedimientos operativos estándar (SOP) que pueden ser incluidos en el programa de la bomba (Figura 4). El analista de un modo automático sólo necesita seleccionar en el panel de control el SOP apropiado para la muestra de producto a analizar. El sistema guía al analista en cada paso, actuando como una guía formativa, y respaldando de este modo las buenas prácticas de análisis en el laboratorio. Los diversos pasos del procedimiento, la velocidad correspondiente de la bomba y la información relacionada se muestran en el panel de control, mejorando la repetibilidad y fiabilidad. Los analistas pueden seleccionar el modo manual o automático. En el modo manual, la bomba pedirá al analista que introduzca datos en cada paso del procedimiento.

Esta bomba avanzada y automática, acelera y facilita el ensayo de esterilidad. Un procedimiento dirigido de 5 pasos garantiza un rendimiento uniforme y preciso al mismo tiempo que reduce el tiempo total del ensayo. Diseñada ergonómicamente para un funcionamiento y limpieza sencillos, existe una bomba que se ajusta al aislador, y otras diseñadas para su uso en la campana de flujo laminar del área estéril. Su diseño asegura la descontaminación perfecta dentro de los aisladores o campanas, eliminando el riesgo de falsos positivos por este motivo. Es posible montarlo y desmontarlo fácilmente durante las tareas de mantenimiento. La bandeja de drenaje, así como las superficies de acero inoxidable pulido 316L, el cabezal de la bomba y la barra soporte pueden limpiarse fácilmente con la mayoría de los agentes sanitizantes.

En las Figuras 5 y 5´: pasos 1 al 5, se muestran los pasos a seguir para realizar el ensayo de esterilidad en un sistema cerrado.



Paso 1- Se colocan los canisters en el cabezal de la bomba y se cierra

Paso 2- Se filtra cantidades equivalentes de producto por ambos canisters.

Paso 3- Se efectúa el lavado de las membranas.

Paso 4- Se añade por separado los medios de cultivo en cada canister.

Figura 5: *Pasos 1, 2, 3 y 4 -Fotografías cortesía de MerckMillipore-*

Paso 5- Se incuban y se examinan los canisters para detectar si hay contaminación según las farmacopeas

Figura 5´: *Paso 5 -Fotografía Cortesía de MerckMillipore-*

Lectura e interpretación de resultados [1,2]

Los envases de medios de cultivo incubados se observan a intervalos regulares, con el fin de detectar crecimiento microbiano por evidencia macroscópica (turbidez).

Cuando se usa el método de Transferencia directa, y el material analizado produce turbidez en el medio y la observación visual del crecimiento o ausencia de bacterias u hongos es dificultosa, a los 14 días de la incubación transferir porciones adecuadas (al menos 1 mL) de la mezcla que contiene la muestra y el medio a envases con medio de cultivo nuevo, incubar no menos de 4 días adicionales y observar nuevamente los envases.

Conclusión:

Si no se observa desarrollo, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad.

Si se observa desarrollo microbiano y los controles negativos indican que el procedimiento del análisis fue inapropiado o los medios o diluyentes o los antagonistas agregados o el material empleado no estaban estériles, el ensayo se declara nulo y debe repetirse. Si el ensayo se declara inválido, se puede repetir con la misma cantidad de muestras. Si no se observa desarrollo, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad. Si se observa desarrollo microbiano, el producto no cumple con el ensayo de esterilidad.

Si se observa desarrollo microbiano confirmado microscópicamente y no existen evidencias suficientes para anular el ensayo, el producto no cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad.

Ensayo de Esterilidad en Aisladores

En los últimos años la tecnología de aisladores está siendo aplicada con muy buenos resultados en la Industria Farmacéutica, tanto para producción de inyectables como para los ensayos de esterilidad. Esto se debe a las innegables ventajas que esta tecnología proporciona en la manipulación de materiales estériles, o para la protección del hombre durante la manipulación de sustancias tóxicas. Los aisladores pertenecen a la tecnología de barreras (*barrier isolator*).

- ***Descripción del aislador***

Los aisladores son recintos herméticos en los cuales no hay contacto directo entre el interior y el exterior. Los materiales son introducidos por lo general con el aislador abierto, ya que todo el interior más los materiales son esterilizados en conjunto. Hay equipos a los que se les puede acoplar otro aislador de transferencia (transfer), cual que es útil para realizar un mayor número de ensayos de esterilidad en un mismo ciclo.

El aire es suministrado al aislador a través de filtros de alta eficiencia, pudiéndose filtrar, de ser necesario, el aire que es expulsado al exterior. El volumen de aire ingresante es mayor al expulsado, manteniendo dentro del aislador una presión positiva que ayuda a mantener la esterilidad del recinto. Estos sistemas son esterilizables con un alto nivel de aseguramiento de la esterilidad y por la constante presión negativa son capaces de mantener la esterilidad por períodos prolongados de tiempo que deben ser validados.[8]

En su construcción pueden emplearse materiales con diferentes grados de resistencia tanto química como mecánica. Por lo antes expuesto se debe hacer un análisis previo de los requerimientos que deberá satisfacer el aislador a fin de que se realice un diseño que cumpla con las expectativas, sin incurrir en costos innecesarios.[8]

Los aisladores estarán constituidos por las siguientes partes fundamentales:

- Filtración del aire ingresante.
- Guantes para la manipulación desde el exterior.
- Puerta de acople para la transferencia de materiales desde un transfer.
- Paredes y mesa de trabajo.
- Equipo para efectuar el test de esterilidad en forma automática

Filtración del aire ingresante. Está formado por ventilador, conductos y filtros. Este sistema permite el suministro de aire a través de prefiltros y filtros de alta eficiencia como los filtros HEPA y ULPA. El flujo de aire puede ser mediante flujo turbulento o unidireccional. El aire podrá ser recirculado o expulsado totalmente pudiéndose encontrar filtración terminal en casos donde se manipulan materiales peligrosos. Este sistema permite el acople a equipos que suministran agentes químicos para la sanitización automática del área interna del aislador.[7,8]

Guantes para la manipulación desde el exterior. Permite la ejecución de las operaciones sin que el operario esté en contacto directo con el producto; esto se logra mediante mangas-guantes. Hay equipos que tienen medias escafandras o escafandras. La selección de una u otra variante estará en dependencia de las características de la operación y la necesidad de que ésta se realice de forma confortable [7,8].

Puerta de acople para la transferencia de materiales desde un transfer. Pueden ser desde un sistema SAS constituido por dos puertas con juntas herméticas, hasta RTPs (sistemas de transferencia rápidos). Estos

últimos son sistemas más sofisticados y eficientes, los cuales permiten efectuar la transferencia de forma más segura minimizando el contacto del medio interno y externo. Los RTPs también permiten el acople entre aisladores.

En la práctica se encuentran ambas variantes con buenos resultados y su utilización está determinada por las características de la operación, las exigencias de aislamiento y los costos particulares de estos dos sistemas, siendo el RTP el más costoso.

Paredes y mesa de trabajo. Éstas pueden ser de diferentes materiales como plásticos rígidos o flexibles, cristal y acero inoxidable [7,8]. Estos materiales poseen diferentes grados de resistencia química y física, así como diferentes costos. Un análisis de los requerimientos de la aplicación permitirá satisfacer las necesidades sin incurrir en costos innecesarios [9]. Debe tenerse en cuanta que el Peróxido de Hidrógeno usado como esterilizante es oxidante y ataca a las superficies. Para evitar el deterioro es importante mantenerlas siempre limpias una vez finalizado cada ciclo de ensayos de esterilidad.

Equipo para efectuar el test de esterilidad en forma automática. Cuando se compra un aislador debe solicitarse el suministro del equipo para efectuar el ensayo de esterilidad en forma automática. En este caso ya la mesada de trabajo está perforada para el acople de la bomba peristáltica, especial para uso en aislador.

- ***Monitoreo del ambiente dentro del aislador:***

En el aislador por lo general se realizan los controles con placas de sedimentación con placas que tienen un envoltorio que no permite el ingreso de Peróxido de Hidrógeno durante la esterilización del equipo. Otra forma de controlar el ambiente es con medio de cultivo líquido en frascos con boca ancha que su cierre no permita el ingreso del esterilizante. También existen muestreadores de aire activos en los cuales el cabezal está dentro del aislador, y el manejo del equipo se hace desde el exterior.

En los aisladores la hermeticidad se comprueba por un leak test que se realiza antes de efectuar la esterilización del recinto, sin embargo algunos pequeños orificios pueden no ser detectados en este ensayo, sobre todo en los guantes, que es el lugar más frágil y crítico. Por eso es conveniente realizar monitoreo de los guantes, además de controlar ausencia de roturas cada un tiempo predeterminado. Este control de realiza sacando los guantes, inflándolos y colocándolos en un recipiente con agua para detectar burbujas si hay una rotura. La frecuencia de este ensayo dependerá de la frecuencia de uso del aislador.

En un aislador todos los monitoreos de superficies y de aire deben dar como resultado la ausencia total de desarrollo microbiano. Cualquier desarrollo debe ser investigado. Si el ensayo se realiza en un aislador, la única posibilidad de contaminación por parte del personal es por la falta de integridad de los guantes del equipo.

- ***Ventajas del aislador***

Una de las ventajas más significativas de esta tecnología es la eliminación de la intervención directa del operador en el área de trabajo, el cual es la mayor fuente de contaminación. Su utilización incrementa el aseguramiento de la esterilidad del ambiente de trabajo, por tal motivo se reducen los falsos positivos. Si se utiliza un sistema correctamente diseñado para la esterilización del aislador, muestras y materiales, las posibilidades de falsos positivos deben ser cero, y por tanto la repetición de los ensayos en estas condiciones es cuestionada.

Otra ventaja es que, según algunos autores principalmente fabricantes de aisladores, no se requieren áreas clasificadas, lo que disminuye los costos de inversión y de mantenimiento. [7] La simplificación de las instalaciones deriva una simplificación del vestuario y se prescinde del uso de ropa estéril.

El método de esterilización de todos los materiales es mediante el agregado de un agente esterilizante en el ambiente del aislador, que luego debe ser barrido con aire estéril hasta la ausencia del agente esterilizante. Se utiliza usualmente peróxido de hidrógeno, o una mezcla estabilizada de peróxido de hidrógeno y ácido peracético. Este procedimiento tiene la ventaja que el aislador no se abre para permitir la entrada de ningún material, y todo lo que está adentro es esterilizado por un volumen de esterilizante y tiempo de contacto validados. La utilización de sistemas automáticos de esterilización permite lograr un ambiente estéril dentro

del aislador de forma más eficiente y segura a diferencia de la "sanitización" que se realiza en las áreas limpias convencionales.

Aunque los aisladores pueden tener una incidencia marcada en el presupuesto de la inversión inicial, los costos se reducen al permitir la simplificación de la instalación, permitiendo además una significativa reducción de los costos durante el uso, y la puesta en marcha puede ejecutarse en un período breve. Esta tecnología puede adaptarse a instalaciones ya existentes dada su flexibilidad.

Debe dejarse en claro que el test de esterilidad dentro del aislador sólo es posible realizarlo con equipos cerrados diseñados para este fin. No es posible aplicar el método tradicional descripto en las farmacopeas. Los equipos cerrados tienen todo tipo de canisters, mangueras y válvulas que permiten la realización de los ensayos para todo tipo de productos.

- **Esterilización del aislador.**

Para lograr y mantener el ambiente estéril dentro del aislador se debe esterilizar el espacio interno y todos los materiales que se introducen en él. Una vez esterilizados, los materiales no deben salir del ambiente estéril de los aisladores, ni otros materiales pueden ser ingresados, salvo por acople de un *transfer* también estéril.

Para la esterilización de los aisladores se utiliza la generación de peróxido de hidrógeno o una mezcla estabilizada de peróxido de hidrógeno y ácido peracético. Es determinante la validación del método empleado, incluyendo la validación de la remoción del agente esterilizante hasta niveles permisibles. En el mercado se dispone de sistemas automáticos que permiten ejecutar la esterilización de forma validable y segura [7,9,14]

El proceso de esterilización debe ser validado con todas las cargas posibles o con la máxima carga. Los materiales deben ser distribuidos en el recinto de manera que el esterilizante esté en contacto con todas las partes. Debe minimizarse el uso de papel, ya que es muy difícil extraer el esterilizante de él. Debe asegurarse que todos los materiales estén por dentro estériles y que no haya posibilidad de penetración del agente esterilizante.

Durante los ensayos de validación se colocan en varios puntos indicadores de esterilización, en los cuales el soporte de las esporas debe ser de metal y no de papel, para el secado rápido del agente esterilizante. En el ciclo de esterilización durante la validación se colocan indicadores por cambio de color que indique visualmente la presencia del esterilizante. También luego de la esterilización deben tomarse muestras de aire para determinar la ausencia de agente esterilizante en el ambiente.

La validación debe incluir que el agente esterilizante no ha penetrado en los materiales, por ejemplo diluyentes y medios de cultivo. Esta comprobación puede realizarse realizando el GPT de los medios luego de ser sometidos a un ciclo de esterilización.

- **Limpieza.**

El estado de limpieza del equipo es fundamental, no sólo porque el acero inoxidable va mostrando signos de oxidación por acumulación de peróxido y las folias de los aisladores flexibles van perdiendo transparencia, sino porque la acumulación de sustancia orgánica en las superficies disminuye la eficacia de la esterilización y sobre de la eliminación del agente al finalizar dicho proceso.

Durante la limpieza del aislador debe lograrse el acceso a todas las partes, en caso de áreas de difícil acceso deben establecerse los procedimientos de desmontaje y la frecuencia para su limpieza. Esta puede realizarse de forma manual o automática. La limpieza de forma automática puede provocar algunos inconvenientes como la necesidad de proteger los filtros y la ubicación de drenajes, lo cual en zonas críticas debe ser debidamente justificado, así como la acumulación de agua en zonas de difícil acceso. Un sistema de limpieza automático (CIP) no puede justificarse por la existencia de zonas de difícil acceso y debe valorarse la efectividad de remoción de la contaminación por la atomización comparada con un proceso manual [8,10,16]

- **Lectura e interpretación de resultados cuando el ensayo de esterilidad se realiza en un aislador**

Cuando el ensayo de esterilidad se realiza en aislador, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad cuando no se observa desarrollo microbiano. Cuando se observa desarrollo microbiano y es confirmado microscópicamente, el producto no cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad.

El ensayo positivo no se considera válido cuando se demuestra pérdida de integridad física del aislador, o por materiales no estériles dentro del aislador. En estos casos se debe repetir el ensayo.

La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por el procedimiento descripto, confirma que el producto satisface los requisitos de la prueba, lo cual no es razón suficiente, para suponer la total esterilidad del lote, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo. Por esta razón deben efectuarse las validaciones de los procesos de esterilización y de llenado aséptico y un continuo entrenamiento del personal que efectúa tanto las tareas de producción como de control microbiológico.

Bibliografía

1. USP vigente. Capítulos <71> y <1208>
2. Eur. Ph. Capítulo 2.6.1.
3. Farmacopea Argentina.
4. Nueva técnica para el control de esterilidad en la industria farmacéutica. Steritest. Millipore.
5. Ficha técnica Sistema Steritest Equinox. Millipore Corporation. Billerica. USA.
6. Guidance for Industry. FDA. *Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products.* Draft. Feb.2008.
7. Wagner C, Akers JE, Lyda JC, Meyer D, Edwards LM, Rickloff JR, et al. *Isolator Technology*. Illinois: Interpharm, 1995:354.
8. Farguson G, Holdings T. *Isolation applications in aseptic processing*. Pharmaceutical Manufacture International. 1995:181-4.
9. Friedman R. *Design of Barrier Isolator for Aseptic processing*: A GMP Perspective. Pharmaceutical Engineering 1998; March/April:30-6.
10. *The Rules Governing Medicinal Products in the European Community*. Vol IV. Good Manufacturing Practices for Medicinal Products. Brussels; September 1996.
11. Akers JE, Agalloco JP, Kennedy CM. *Experience in design and use of isolator system for sterility testing*. PDA J Pharm Sci Technol 1995;49(3):140.
12. M. Sc. Thamara Figueroa Rodríguez. M. Sc. Martha Gómez Carril. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba. Febrero del 2001. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba. Febrero del 2001.
13. Agalloco J. *Oportunities and obstacles in the implementation of Barrier Technology*. PDA J Pharm Sci Technol 1995; 49(5):244.
14. Lysljord J, Haas PJ, Malgaard HL, Pflug IJ. T*he potential for use of steam at atmospheric pressure to decontaminate or sterilize parenteral filling lines incorporating Isolator Technology*. PDA J Pharm Sci Technol 1995;49(5):212.
15. Callant BT. *Citotoxic Drug Containment*. Pharmaceutical Engineering 1994; Nov/Dec:56-62.
16. Browne S, Hony J, Lund R. *Use of Isolators in a Specials Manufacturing Environment.* European J Parenteral Sci 1999;4(2):43-7.
17. Millipore report. *Effect of Membrane Filter Pore Size on Microbial Recovery and Colony Morphology. https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-GSWP01300&DocumentId=201306.9737.ProNet&DocumentUID=2954215&DocumentType=TI&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP*

Capítulo V.2.

Endotoxinas bacterianas

Beatriz Giampaolo y Nélida Mondelo

Endotoxins possess an intrinsic fascination
that is nothing less than fabulous. They seem to
have been endowed by nature with virtues and vices in
the exact and glamorous proportions needed to render
them irresistible to any investigator who comes to know them
Ivan L Bennet Jr-John Hopkins University [1]

1. *Introducción*
2. *Sustancias piretogénicas*
3. *Endotoxinas Bacterianas: estructura, propiedades biológicas y fisicoquímicas*
4. *Despirogenización*
5. *Endotoxinas Bacterianas: Fuentes de contaminación y su prevención*
6. *Ensayo de Endotoxinas Bacterianas*
   - *6.1. Surgimiento y fundamentos*
   - *6.2. Metodologías de Ensayo de Endotoxinas Bacterianas*
   - *6.3. Aspectos Prácticos*
     - *6.3.1. El Lisado Reactivo*
     - *6.3.2. La Endotoxina Estándar*
     - *6.3.3. El Agua Reactivo*
     - *6.3.4. Los Equipos e Instrumentos*
   - *6.4. Establecimiento de Límites de Endotoxinas*
   - *6.5. Máxima Dilución Válida*
   - *6.6. Prueba preliminar de interferencias (inhibición/activación)*
     - *6.6.1. Posibles causas de interferencias*
     - *6.6.2. Búsqueda de soluciones para superar interferencias*
   - *6.7. Prueba definitiva de interferencias (inhibición/activación)*
   - *6.8. Ensayo de rutina*
     - *6.8.1. Muestra*
     - *6.8.2. Soluciones*
     - *6.8.3. Ensayo*
   - *6.9. Interpretación de los resultados*
   - *6.10. Aplicaciones*
7. *Selección de métodos*
   - *7.1. Reemplazo del Ensayo de Piretógenos en conejos por métodos LAL*
   - *7.2. Distintas técnicas de Ensayo de Endotoxinas Bacterianas (ensayo LAL)*
   - *7.3. Ensayos de piretógenos in vitro*
8. *Enfoques novedosos para la detección de Endotoxinas Bacterianas: el ensayo de Factor C recombinante*
9. *Cuestiones de Garantía de Calidad*
   - *9.1. Calificación del analista*
   - *9.2. Calificación de equipamiento/Validación del Proceso de despirogenación*
   - *9.3. Situaciones que requerirán nuevas pruebas de interferencia*
   - *9.4. Resultados fuera de especificaciones (OOS)/Ensayos no válidos*
   - *9.5. Integridad de datos*
10. *Cierre*
11. *Agradecimientos*

1. Introducción

La fabricación de productos inyectables en la industria farmacéutica y de dispositivos médicos incluye entre sus requisitos esenciales, minimizar las fuentes de piretógenos durante la fabricación y los consecuentes riesgos de contaminación y/o impurezas o inactivarlos/removerlos según el caso [2,3].
En este capítulo se ofrecerá una visión general de la estructura, propiedades fisicoquímicas y biológicas de las sustancias piretogénicas más relevantes: las Endotoxinas Bacterianas (EB). Asimismo, se hará énfasis en las fuentes de contaminación, su prevención, los aspectos regulatorios y prácticos del desarrollo, validación y uso rutinario de algunas de las variantes metodológicas disponibles para su control en especialidades medicinales, ingredientes farmacéuticos activos, excipientes, y dispositivos médicos, entre otros.

2. Sustancias piretogénicas

Se define como piretógeno a toda sustancia que, cuando es inyectada en sangre o LCR en humanos o en animales de experimentación, produce fiebre [4]. Pero, como veremos en la siguiente sección, ésta es sólo una de las múltiples respuestas que se desencadenan como respuesta del organismo al ingreso de un piretógeno "exógeno"[5,6,7,8].

Las EB, descriptas por primera vez y en forma casi simultánea por Richard Pfeiffer [9] y Eugenio Centanni [10] a fines del siglo XIX, se reconocen como los piretógenos más frecuentes y se originan en bacterias Gram negativas. Éstas, además de la pared celular (mureína o peptidoglicano) que caracteriza a las bacterias en general y que contribuye a su rigidez mecánica, poseen una capa adicional externa compuesta por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) de alto peso molecular (PM). Sólo algunas pocas especies de bacterias Gram negativas, como las *Sphingomonas*, carecen de LPS.

Las EB se liberan continuamente en el medio en que se encuentran las bacterias, en pequeñas cantidades durante su división y en mayoría, durante su lisis. **Por esto, un producto estéril no necesariamente será apirogénico**. Si bien las EB suelen nombrarse indistintamente como LPS, la aplicación del primer término correspondería, más precisamente, al producto "natural" mientras que el segundo aplicaría a la forma purificada empleada como estándar por la industria farmacéutica [2] y como tal, según el método de extracción puede contener componentes varios de la membrana celular (fosfolípidos, proteínas, glucanos, ácidos nucleicos).

La importancia de las EB radica en su naturaleza ubicua, su mayor toxicidad en relación a otros piretógenos, estabilidad frente a condiciones extremas de tratamiento, su ocurrencia en soluciones de uso parenteral y su tamaño demasiado pequeño para ser retenidas por filtros esterilizantes convencionales.

Un pequeño número de otros piretógenos -no EB- (ácidos lipoteicos y peptidoglicanos) pueden provenir de bacterias Gram positivas, hongos o virus [2]. Bajo buenas prácticas de manufactura (BPM), sin embargo, se justifica la conclusión de que la ausencia de EB "por debajo de valores límite" implica ausencia de componentes piretogénicos.

3. Endotoxinas Bacterianas: estructura, propiedades biológicas y fisicoquímicas

La estructura básica activa de las EB es la de un LPS con 3 fracciones unidas covalentemente: lípido A- que, además de ser responsable de la mayoría de los efectos biológicos (ej. toxicidad) les confiere estabilidad y resistencia, un polisacárido central y un polisacárido O-específico, que se extiende en el medio en que se encuentra la bacteria, de estructura altamente variable y que le confiere antigenicidad [3,11]. La región central y el lípido A se encuentran parcialmente fosforilados, lo que le confiere a la endotoxina una carga neta negativa (Ver Figura 1).

La inyección de LPS purificado o bacterias Gram negativas muertas produce en animales de experimentación y en humanos una secuencia de eventos mediados por la activación del sistema inmune, especialmente monocitos y macrófagos, con liberación de mediadores tales como interleuquinas (IL1, IL 6) , factor de necrosis tumoral y otros que se manifiesta con fiebre, modificación del recuento de la serie leucocitaria, activación del complemento, del metabolismo hepático y del músculo con gluconeogénesis pudiendo desencadenar coagulación intravascular diseminada, necrosis tumoral, hipotensión, shock y muerte [5,12,13].La estructura anfifílica de las EB (polisacárido hidrofílico y lípido A hidrofóbico), asociada a sus propiedades biológicas tóxicas [14], también dificulta su remoción

durante la elaboración farmacéutica o puede afectar la capacidad de detección durante los controles por adsorberse con facilidad a distintas superficies como el vidrio, plásticos u otras [15,16].

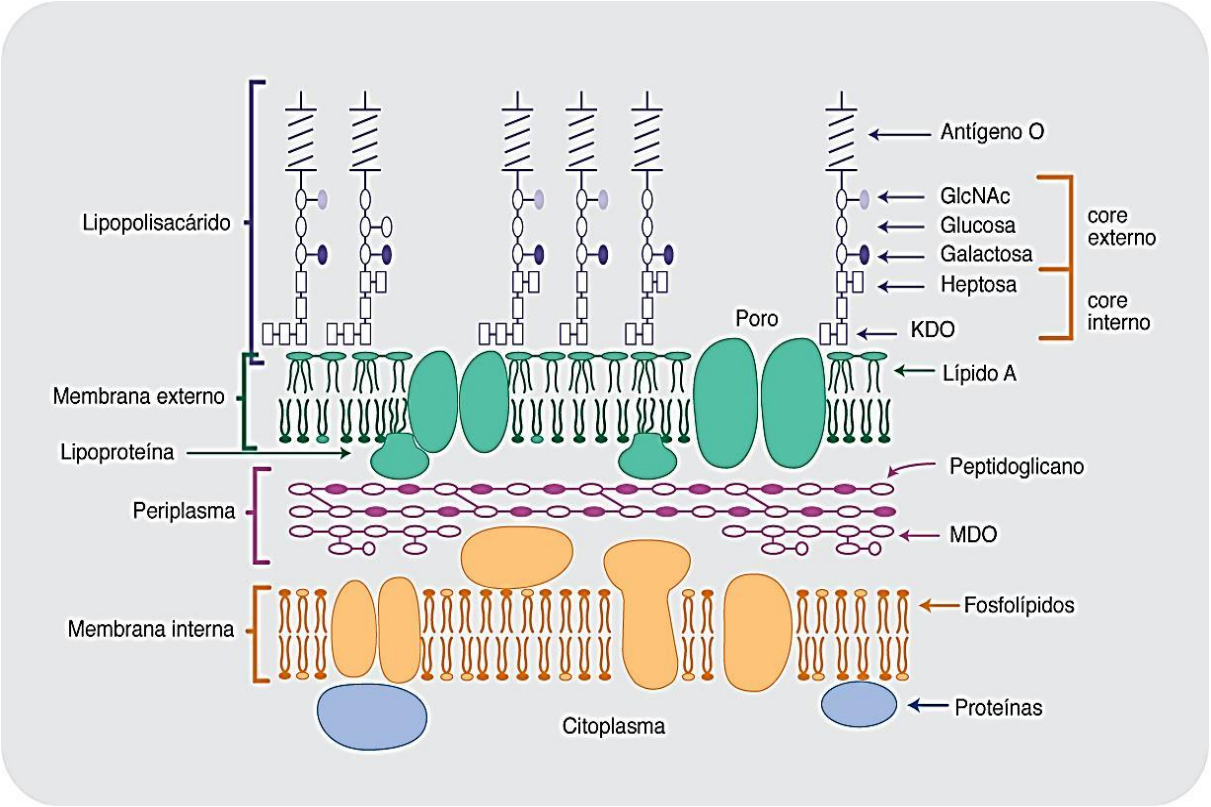


Figura 1: *Representación molecular de la cubierta externa de Bacterias Gram negativas según cita (11). Óvalos y rectángulos representan residuos de azúcares. Círculos representan cabezas polares de glicerofosfolípidos (fosfatidiletanolamina en círculos llenos y fosfatidilglicerol en círculos vacíos). MDO representa oligosacáridos derivados de membrana. GlcNac representa N-acetilglucosamina KDO representa ácido 2-ceto 3-deoxi D manooctulosónico*

Son moléculas muy estables, altamente resistentes a extremos de calor y pH cuando se las compara con proteínas [17]. Pueden presentar diferentes estados de agregación y encontrarse en solución acuosa y en ausencia de niveles significativos de cationes divalentes y agentes surfactantes y quelantes, con un PM que puede alcanzar valores de aproximadamente 10^6 Daltons. Cationes divalentes (como Ca^{2+} y Mg^{2+}) estabilizan agregados moleculares mayores mientras que agentes surfactantes o quelantes pueden producir desagregaciones llegando a subunidades de 10.000 o 20.000 daltons[18].

Su capacidad de adsorción a superficies y de modificar estado de agregación son aspectos básicos a considerar al seleccionar o evaluar los procesos más convenientes para minimizar riesgos de contaminación, para despirogenizar y también al interpretar resultados del control de las mismas.

4. Despirogenización

La despirogenización puede realizarse por detoxificación o destrucción del LPS (esterilización por calor seco, tratamiento con ácidos, bases, agentes oxidantes o alquilantes, etc.) o remoción de las EB, aprovechando en este segundo enfoque, sus características biomoleculares de tamaño y afinidad (destilación, ósmosis inversa, filtración, ultrafiltración, adsorción, etc.)[19,20]. USP ha actualizado el capítulo relacionado con este tópico incluyendo la selección del método de despirogenización más apropiado según el material a tratar y su validación, haciendo especial énfasis en el método de uso más frecuente para materiales termoestables (por calor seco)[21].

La despirogenización por calor seco es el método por excelencia para la destrucción del LPS y clásico cuando se trata de sustancias resistentes al calor (ej: material de vidrio). Los equipos necesarios para llevar adelante este

proceso caen en dos categorías: estufas (proceso discontinuo o en *batch*) y túneles continuos. Como otros equipos, se calificará su instalación (IQ) y su operatividad (OQ) y se evaluará la distribución de temperatura en condiciones sin carga (equipos vacíos) y con carga simulando las condiciones del producto real. La confirmación de la despirogenización (ver también sección 9.2) no necesariamente incluirá adición de material de desafío a los artículos de carga para demostrar reducción de 3 unidades logarítmicas. USP señala que ese requisito puede ser inapropiado como patrón universal en los tiempos modernos y no necesario cuando los estudios de tiempo y temperatura indican cumplimiento de condiciones de despirogenización. Por otro lado, en el capítulo específico de la prueba de endotoxinas bacterianas [22] refiere al proceso cuando aplica a los materiales termoestables vinculados a la misma y refiere que habitualmente se usan 30 minutos a 250 °C como tiempo y temperatura mínimos.

La esterilización por Calor húmedo (121 ºC/ 15 psi - 20 min) es inefectiva para destrucción de EB, por lo que es importante recordar una vez más que esterilización no se acompaña con despirogenización. Se ha intentado su empleo asociado a soluciones de peróxido de hidrógeno para despirogenizar botellones de preparación o recolección de soluciones. En este caso, su eficacia será dependiente de factores tales como concentración, tiempo, temperatura y pH. Se trata de un enfoque que, como ocurre con otros métodos químicos, ofrece las dificultades propias de la validación del sistema de limpieza de residuos.

La destilación es el método por excelencia para obtención de agua calidad inyectable, dejando detrás grandes aglomerados de piretógenos durante la etapa de evaporación. Otros métodos de remoción basados en tamaño molecular, si adecuadamente mantenidos, son la Osmosis inversa (OI) y la ultrafiltración (UF). Mientras la OI se acepta como método alternativo para la obtención de Agua para inyectables no puede emplearse para otros productos. La UF es considerada un método de alta eficiencia para purificar productos de uso parenteral distintos de agua, no sólo como parte de un proceso productivo si no también con fines analíticos como veremos más adelante [23].

Los distintos métodos de filtración esterilizante empleando membranas de 0,22 μm utilizados frecuentemente en la fabricación de inyectables, resultan altamente efectivos para prevenir la contaminación con EB. Por el contrario, en general, el empleo sólo de membranas de 0,45μm, no es suficiente.

Se describe un buen número de alternativas empleando membranas que exhiben diferentes capacidades de adsorción por unidad de área [24,25] incluyendo la incorporación de distintos agentes (ej. polilisina/ polietilenimina) [26] y con distinta performance para reducir el nivel original de endotoxinas o agentes con los que ocurren fenómenos de afinidad, en columnas que permiten su regeneración posterior. Entre estos agentes inmovilizantes de EB se encuentra la histidina [27], histamina, polimixina B [28], la proteína aumentadora de la permeabilidad-bactericida BP [29,309], heparina, lisado reactivo [31]. En estos casos, se aprovecha de las propiedades hidrofóbicas y la carga negativa de las EB (a diferencia de la UF, por ejemplo, donde las endotoxinas se excluyen por tamaño molecular). Otros enfoques también han considerado centrifugación en gradientes de sacarosa y separación de fases con Triton X-114 o cromatografía de intercambio aniónico [32]. Estas últimas opciones, podrían beneficiar a áreas más específicas y asociadas a procesos productivos de alta complejidad o para productos lábiles (biotecnológicos por ej.) [32] y de investigación y desarrollo. Tal es el caso de tubos para microcentrífuga conteniendo partículas de resina acopladas a una proteína neutralizante de endotoxinas, para volúmenes pequeños de 1 a 2 ml y con alta capacidad de retención de endotoxinas. La Radiación γ, utilizada para esterilización de jeringas y dispositivos médicos críticos - aquellos con contacto directo o indirecto con el sistema cardiovascular- y algunas materias primas biológicas como enzimas, presenta índices importantes de despirogenización, aunque es muy dificultoso implementar la validación del proceso. En nuestra experiencia y la de otros autores [33], dosis usuales de esterilización con radiación γ de 25 - 35 kGy pueden reducir los niveles iniciales de EB en viales con endotoxina liofilizada hasta un porcentaje del 30 %. En otros casos, por ejemplo para implantes de pieles congeladas, fue necesario aumentar las dosis de radiación usuales (a 50 kGy), afectando la integridad de los mismos [34,35,36].

En cuanto a los métodos químicos, el tratamiento con bases como hidróxido de sodio que produce la destrucción por saponificación de los ácidos grasos en el lípido A [37,38] mientras que, el tratamiento con ácidos como clorhídrico o acético, se asocia con la ruptura parcial de la unión de la cadena del polisacárido al ácido graso y eliminación del primero por ser hidrosoluble, con la desventaja de que el Lípido A puede permanecer, en teoría, adsorbido en paredes de envases de vidrio, por ejemplo, y liberarse con cualquier proceso de tratamiento, extracción o formulación . Estas técnicas podrían aplicarse en tratamientos de limpieza de cierto tipo de envases, tomando en consideración eventuales fenómenos de corrosión.

Para la necesaria preservación microbiológica en sistemas de almacenamiento y distribución de aguas, suele emplearse ozonización, mediante procesos controlados de dosificación y desozonificación aptos para el fin propuesto.

El óxido de etileno (poderoso agente alquilante) también es empleado para despirogenar sustancias termolábiles o dispositivos métodos. Como todos los métodos químicos, la desventaja, como ya dijéramos, reside en la necesidad de un adecuado control de los residuos.

5. Endotoxinas Bacterianas: Fuentes de contaminación y su prevención

A menudo se cree que el control de producto terminado es el determinante absoluto para establecer que el producto está libre de contaminantes. Sin embargo, deben enfatizarse las BPM, controles durante el proceso y validación del mismo.

En Argentina, se cuenta con amplia normativa aplicable en la elaboración de formas farmacéuticas inyectables, dispositivos médicos críticos y otras preparaciones de uso hospitalario como nutricionales, oncológicas, etc., en las que se encuentran los requerimientos de calidad de ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) y su elaboración, excipientes, productos biológicos/biotecnológicos incluyendo hemoderivados, materiales de envases, instalaciones, equipamiento y procesos [39,40, 41]

Dentro de los insumos, el agua es considerada fundamental en la elaboración de productos inyectables. Puede estar presente como excipiente o usarse para la reconstitución de productos farmacéuticos, emplearse para la síntesis de ingredientes activos, durante la producción del producto terminado o como agente de limpieza de recipientes, equipos y envases primarios [42]. Sus sistemas de producción, almacenamiento y distribución deben ser diseñados acorde a lo codificado en Ph Eur [43] y USP [44] para Agua Calidad Inyectable y validados, de forma de prevenir la contaminación microbiana, disminuir los riesgos de formación de bio-películas propios de las bacterias Gram negativas, y en consecuencia los riesgos de generar una fuente de EB asociadas a microorganismos muertos o libres en el medio [45]. La circulación constante a una temperatura superior a 70°C o no más de 4°C, es esencial como método de preservación microbiológica y de formación de EB.

En los procesos de elaboración de inyectables, los puntos críticos de control de procesos se ubican en áreas elaboración de soluciones, fraccionamiento y de preparación de materiales / lavado y despirogenización de envases y tapones, equipos y recipientes.

Todas las soluciones deben ser filtradas antes del proceso de llenado, debiendo demostrarse la efectividad del proceso, la carga biológica antes y después, limitando el tiempo total de la filtración de forma de evitar la penetración del filtro por microorganismos y EB. Antes de la esterilización, la carga biológica deberá ser mínima y después, deberá establecerse un límite funcional para la contaminación, relacionado con la eficiencia del método y el riesgo de sustancias piretogénicas. Los límites de aceptación serán más estrictos si no hay un paso de depleción de endotoxinas.

La búsqueda de endotoxinas estará muy ligada a aquellos procesos en los que no hay un paso de despirogenización como parte de los mismos. En cuanto a las materias primas, la Ph Eur en el capítulo correspondiente [46] especifica que propiedades adicionales deberán cumplir según el proceso de elaboración o de formulación de preparaciones parenterales, incluyendo requerimientos, claramente preestablecidos de grado estéril, libre de piretógenos o libre de EB.

El flujo sanitario de ingresos de materias primas, envases, recipientes de productos a granel, equipos y cualquier otro artículo necesario en las áreas limpias clasificadas donde se efectúen trabajos asépticos, debe estar suficientemente controlado. Si en cambio, el proceso involucra remoción-lavado de tapones-/inactivación de endotoxinas-despirogenización por calor seco de equipos, esta etapa debe ser validada. Mientras tanto, asegurar el secado de cualquier equipo luego de su limpieza, excepto se proceda en forma inmediata a su esterilización/ despirogenización es imperativo [3].

Se requiere un programa efectivo de monitoreo microbiológico para que el proceso de llenado aséptico se encuentre bajo control. Los principios básicos para validación y certificación de procesos esterilizantes y asépticos se encuentran bien descriptos en USP [45].

En el caso de dispositivos médicos, cada fabricante debería evaluar el potencial de pirogenicidad de cada dispositivo. Por ejemplo, los factores críticos pueden incluir -aunque no están limitados por- procesos húmedos en

los cuales agua y otros materiales acuosos se utilizan como parte del proceso de fabricación (enjuague, lavados, etc.) comparativamente con el menor riesgo de fabricación en seco a altas temperaturas (plásticos extrudados con calor) o ensamble de materiales (líneas de ensamblado de kits) en los que el proceso entero puede hacerse sin agua o procesos acuosos [3]. Ingredientes tales como anticoagulantes para bolsas de recolección de sangres, también deberán ser ensayados con iguales requerimientos de una droga o fármaco.

Si se han conducido ensayos sobre Ingredientes activos, excipientes, agua y durante el proceso y éste se encuentra apropiadamente controlado, la liberación de un producto terminado no debería enfrentarnos a un problema de contaminación.

6. Ensayo de Endotoxinas Bacterianas

6.1. Surgimiento y fundamentos

Fueron Levin y Bang quienes, en 1964, identificaron que la coagulación intravascular diseminada y muerte en el cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*) [47] era debido a la presencia de endotoxinas provenientes de bacterias Gram negativas. Accidentalmente este hecho había sido descubierto 50 años antes en un Centro de Investigación Marina de EE. UU.

Esta reacción de gelificación ocurre debido a una reacción enzimática en cascada (ver Figura 2) que requiere la presencia de endotoxinas y las proteínas contenidas en amebocitos, las células sanguíneas circulantes de la hemolinfa de ciertas especies de Cangrejos Herraduras (en particular, *Limulus polyphemus* y *Tachypleius tridentatus)*.

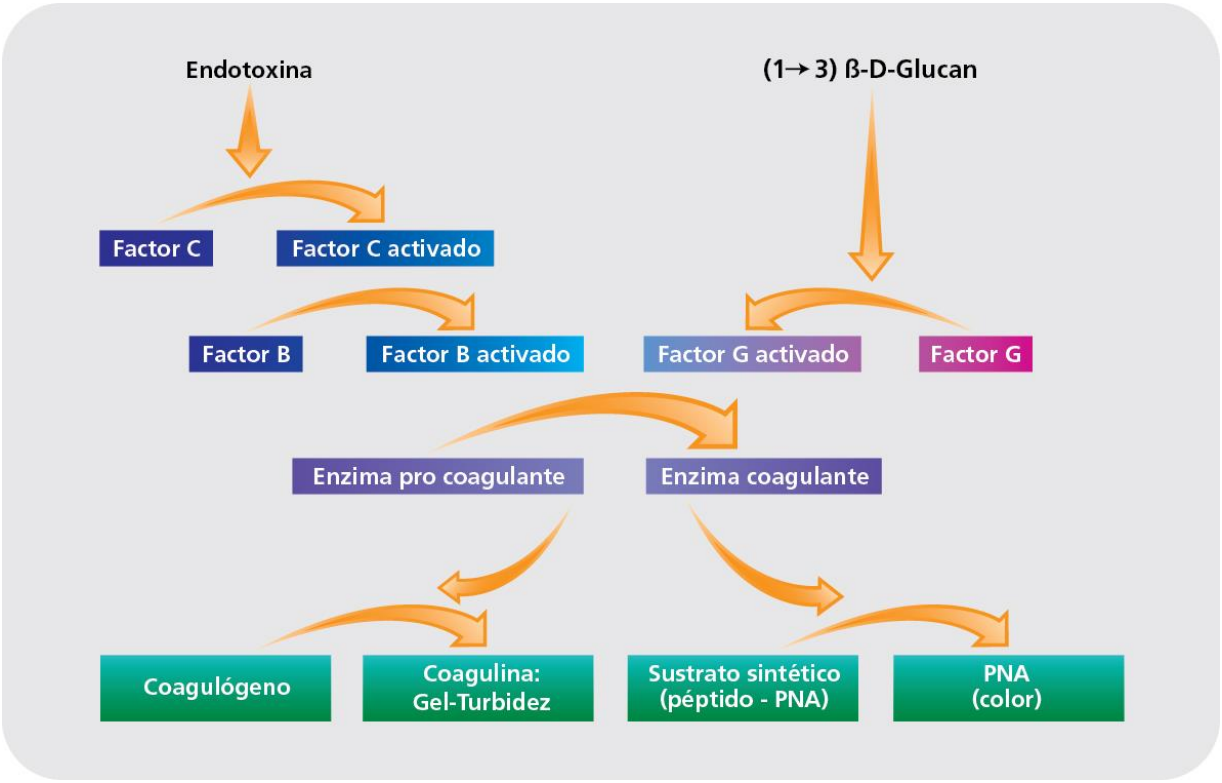


Figura 2: *Representación esquemática de la cascada enzimática que responde a la activación por EB- base de los ensayos de detección disponibles- y por (1,3)-β-D-glucanos.*

En 1969, Cooper y colaboradores decidieron aplicar la activación de la cascada enzimática de defensa de los cangrejos con respuesta de gelificación al diseño de un bioensayo muy sensible para la detección y cuantificación de endotoxinas popularmente conocido como ensayo del Lisado de amebocitos de *Limulus* (ensayo LAL), ya que en este lisado, obtenido a partir de hemolinfa anticoagulada, se encuentran los

factores necesarios (factores B, C y la enzima procoagulante, todos con actividad serin-proteasa) para, en respuesta a la presencia de endotoxinas, formar un coágulo gelatinoso (pasaje de coagulógeno a coagulina insoluble) [48].

En 1973, la FDA anunciaba que el reactivo LAL era un producto biológico sensible a las EB, aun cuando en esa época no se pensaba en el reemplazo del ensayo *in vivo.*

En 1977, los reactivos para el EEB se comercializaron por primera vez, como productos licenciados y bajo regulaciones FDA para controles de proceso.

Varios estudios entre la industria farmacéutica y de dispositivos médicos y las agencias regulatorias han sido claves en la aceptación del ensayo de EB como reemplazo del histórico método de evaluación de piretógenos en conejos como ensayo de liberación de producto terminado. A modo de referencia pueden citarse el de la Health Industry Manufacturers Association (HIMA) y la FDA [49] estableciendo la dosis umbral piretogénica a partir de una endotoxina purificada de Difco. Para ese entonces, aún no se contaba con un estándar apropiado de referencia que permitiera comparación precisa de resultados entre laboratorios.

Gran impacto regulatorio generó el estudio de Mascoli y Weary [50] al confirmar, tras la comparación de resultados de aproximadamente 150.000 ensayos de EB *in vitro* (EEB) y 28.000 ensayos de piretógenos *in vivo* en dispositivos médicos y soluciones parenterales, que los piretógenos hallados siempre fueron de origen bacteriano, que en una mayoría su presencia fue inadvertida en el ensayo *in vivo*, mientras que, por otro lado, no se detectó ocurrencia inexplicable de falsos negativos en el ensayo *in vitro*. Esto llevó a la FDA a aprobar el ensayo, y en el año 1980 aparece en USP XX el primer capítulo informativo sobre el EEB seguido al poco tiempo, por el lineamiento de la FDA relacionado con la validación del método, para productos terminados de uso parenteral, dispositivos médicos y productos biológicos [51]. Por su lado, la Comisión Europea, a comienzos de los 80, emprendió estudios propios y ya en 1985 recomendó la implementación del EEB a la Industria y Organismos de salud de los estados miembros.

Durante la década del 80, grupos de investigadores japoneses [52,53] se dedicaron ampliamente a estudiar el mecanismo de gelificación del LAL y también desarrollaron el método cromogénico. Describieron a la enzima coagulante como un prototipo de las serin-proteasas, que participan en la coagulación de la sangre humana y los cambios estructurales que produce sobre el coagulógeno, como una proteolisis limitada a nivel del grupo amino terminal con clivaje (similar a lo que ocurre con la trombina en la coagulación humana) en secuencias Arg-Gly y Arg-Thr, con posterior conformación del gel de coagulina desde el coagulógeno. El método cromogénico para el EEB se desarrolló fundamentado en la hidrólisis de sustratos específicos que poseen, en grupo carboxi terminal, una secuencia Gly-Arg acoplada al cromóforo p-nitroanilina (pNA), que, cuando se libera como paso final de la activación de la cascada enzimática, puede ser cuantificado por espectrofotometría [54].

Las primeras monografías que reconocieron oficialmente al EEB fueron las correspondientes a aguas para inyección y para irrigación y las de varios radiofármacos. Paulatinamente, en los siguientes años, el ensayo de piretógenos en conejos fue desplazado como método de control en la gran mayoría de los productos en los que aplicaba, siendo tal vez los antineoplásicos los siguientes productos cuyas monografías reemplazaron el ensayo en conejos por el EEB, reemplazo al que adherimos rápidamente en nuestro país [55]. En revisiones de la USP XXIII, efectivas a partir del año 1993, el EEB pasó a ser compendial para liberación de la mayoría de los productos inyectables, reemplazando al ensayo de piretógenos en conejos. En este capítulo sólo se describía al método de gel en tubo, y mencionaba como alternativas emergentes, si adecuadamente validadas, a los métodos cromogénico y turbidimétrico (ver ítem 6.2).

En los comienzos de los 90, también se publicaron listas con límites de endotoxinas para un número importante de especialidades medicinales [56]. Hasta ese momento esos límites se calculaban en base a dosis en ensayo de piretógenos y generalmente había diferencias con las estimadas por los fabricantes.

En el año 2001, se adopta un EEB armonizado por las regiones vinculadas a la ICH. ICH Q4B Annex 14[57] indica que los procedimientos analíticos descriptos en farmacopeas oficiales (Ph Eur 2.6.14; JP 4.1 y USP <85>) podrán usarse en forma intercambiable tomando en consideración el empleo de estándares de endotoxina calibrados frente al Estándar Internacional de la OMS, cualquiera sea la metodología empleada y manteniendo como ensayo de referencia, en caso de disputa, al ensayo de gel en tubo, que describiremos más adelante en este capítulo (lo cual no debe interpretarse como el método al cual puede recurrirse para liberar un producto con resultado fuera de especificaciones bajo otra metodología habitual validada).

A partir de la 6ta edición de la Farmacopea Europea, se ha propuesto al EEB como opción de control válida para ciertos hemoderivados bajo determinadas circunstancias [58]

Actualmente es reconocida la alta especificidad del EEB tal como se describe en las distintas farmacopeas, habiéndose reconocido como activadores no específicos a (1,3)-β-D-glucanos-polímeros de moléculas de glucosa- y permitiendo el uso de reactivos LAL que no reaccionen con ellos [22,59].

En Argentina, la Farmacopea Argentina incluyó una monografía general en su revisión actualizada del año 2003 [60].

6.2. Metodologías de Ensayo de Endotoxinas Bacterianas

La adición de endotoxinas a un lisado de amebocitos del *Limulus polyphemus* puede producir gelificación, turbidez o coloración.

Los métodos corrientemente empleados son

- Gel en tubo
- Técnicas Fotométricas: ensayos cromogénicos o turbidimétricos, de punto final o cinéticos.

Las Farmacopeas [22,59,60] describen detalladamente los distintos pasos para la ejecución de un buen EEB, por lo que consideramos imprescindible su lectura e innecesaria una reiteración de los mismos. Cualquiera sea la técnica seleccionada, deberán cumplirse los requerimientos de confirmación de sensibilidad de los reactivos/parámetros de curva de calibración y "no interferencia" (inhibición/activación).

Es necesario utilizar reactivos y estándares fabricados por elaboradores que cuenten "con licencia de autoridades sanitarias reconocidas", que ofrezcan rótulos, certificados de análisis e insertos con información completa: identificación, sensibilidad de lisado reactivo, certificado de establecimiento de la potencia de endotoxina estándar, descripciones del modo de preparación y conservación de reactivos, procedimientos e interpretaciones.

Como ya anticipáramos, las Farmacopeas y las ICH siguen considerando al método de gel en tubo (USP aclara: Ensayo Límite, ver a continuación) como método de referencia en caso de dudas y disputas.

Técnica de gel en tubo basada en la formación del coágulo gelatinoso fue la primera técnica incluida en Farmacopeas. La ventaja de este método es su simplicidad, ya que la decisión de aprobar o rechazar el producto examinado se basa, en la forma de Ensayo Límite, en la ausencia o presencia de gelificación en una determinada concentración de trabajo, visible a simple vista. La opción de emplearlo en "modo semicuantitativo" permitirá estimar en forma aproximada, según diluciones empleadas, la cantidad de EB y su cercanía o lejanía de la concentración establecida como límite aceptable (lo cual, entre otras utilidades, puede ser relevante en investigaciones de tendencias y controles de procesos).

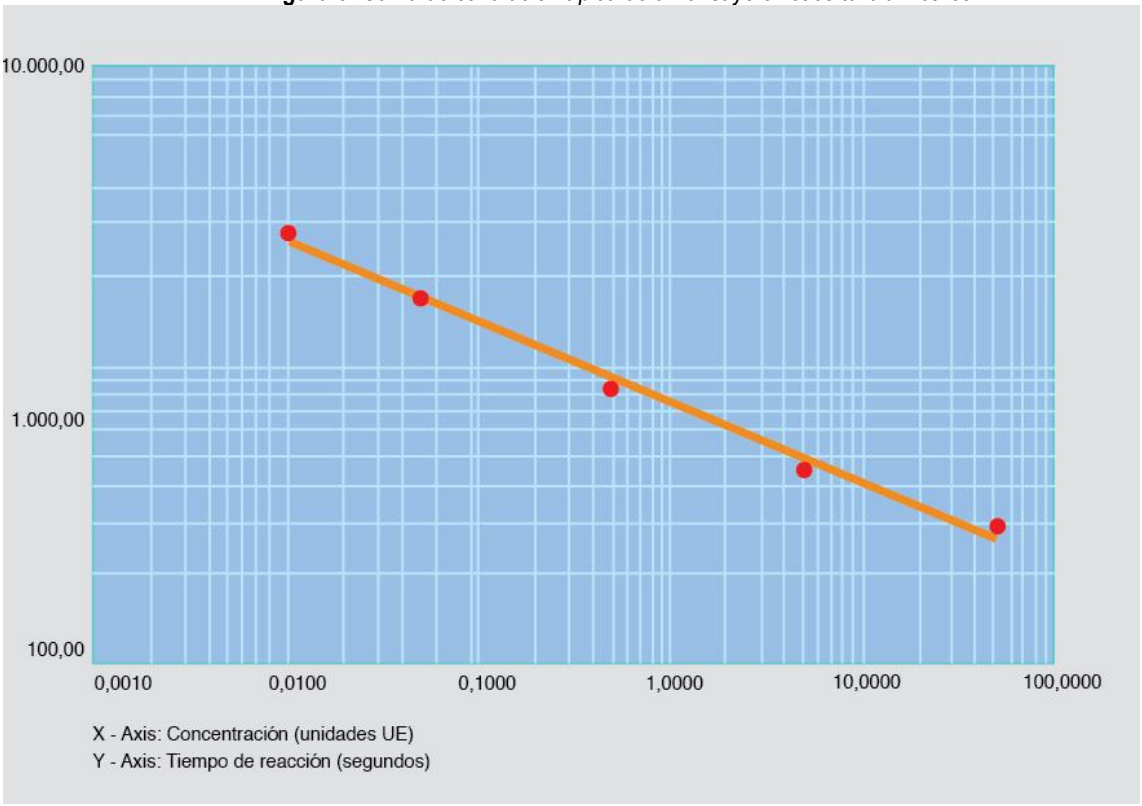
Técnicas fotométricas -de punto final o cinéticas-: se basan en cambios de densidad óptica por coloración o turbidez

- **En las técnicas cromogénicas** se cuantifica la concentración de un cromóforo amarillo (9-nitroanilina –pNA-, a 405 nm) acoplado a una secuencia Gly-Arg de un sustrato sintético. En el método de punto final la reacción se detiene, al cabo de un tiempo preseleccionado. En casos de interferencia- muestras que absorban a la longitud de onda de la p-NA, se puede acoplar el cromóforo por medio de una reacción de diazotación. El modo "cinético cromogénico" se fundamenta en la regresión lineal que guarda el logaritmo del tiempo en el que se alcanza un determinado nivel de color (absorbancia) con el logaritmo de la concentración de endotoxina estándar.
- **El ensayo turbidimétrico (ET**) mide el cambio de turbidez que acompaña a la formación del gel como resultado de la transformación del coagulógeno en coagulina.

En los métodos de punto final, la cuantificación requiere una curva de calibración generada con valores de densidad óptica al finalizar un período de incubación con distintas concentraciones de Endotoxina Standard. La reacción no se detiene y por razones prácticas, esta alternativa no es conveniente y, hasta donde

sabemos, no se encuentra disponible comercialmente [61]. En el ET cinético, la curva de calibración (Figura 3) incluirá en el eje de ordenadas valores transformados -en logaritmos- de tiempos de reacción para alcanzar un nivel predeterminado de turbidez (en inglés "*onset time*", en segundos hasta un nivel de, por ej. 0,05 unidades de absorbancia) y, en el eje de las abscisas, el logaritmo de concentraciones de endotoxina estándar.

Figura 3. *Curva de calibración típica de un ensayo cinético turbidimétrico*



6.3. Aspectos prácticos

A pesar de lo antedicho, creemos que algunos aspectos prácticos pueden resultar de utilidad para algunos usuarios del EEB y es recomendable que los detalles se incluyan en procedimientos operativos estándar (POEs)

6.3.1. El Lisado Reactivo

Todos los lisados reactivos se comercializan con una sensibilidad (λ) que el fabricante declara en el rótulo, la cual se expresa en UE o UI/ml (gel en tubo) o, en el caso de métodos cromogénicos o turbidimétricos, corresponderá al menor punto de concentración de la curva de calibración.

Es responsabilidad del usuario reconstituirlo y conservarlo de acuerdo a las instrucciones del fabricante y para cada nuevo lote de lisado (LAL) reactivo, confirmar la sensibilidad declarada en el rótulo o verificar cumplimiento de parámetros de curva de calibración, según corresponda e investigar las causas en caso de desvíos (que pueden asociarse a problemas de conservación o reconstitución del reactivo o del estándar o de la ejecución del ensayo). **Para esta confirmación/verificación, se empleará un estándar farmacopeico o el estándar internacional** (ver secciones 6.6 y 6.7). En métodos de gel en tubo el valor estimado por el usuario deberá encontrarse dentro del 50 al 200 % del valor declarado. Si, a modo de ejemplo, la sensibilidad declarada fuera de 0,06 UE/ml y el valor estimado en el ensayo en nuestro laboratorio de 0,12 UE/ml, se dará por confirmada la sensibilidad indicada por el fabricante y, se usará el valor del rótulo a los efectos del cálculo del nivel de endotoxinas en muestras ensayadas con ese lote de lisado reactivo.

En ensayos fotométricos, el valor absoluto del coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración debe ser mayor o igual a 0,980. La menor concentración de esa curva válida será el valor a considerar en cálculos de contenido de endotoxinas en una muestra.

6.3.2. La Endotoxina Estándar

El primer estándar de referencia de endotoxinas fue establecido en 1985 por la USP (USP RSE) y, al poco tiempo las Farmacopeas Japonesa y Europea contaron con los suyos propios. Durante un tiempo, cierta incertidumbre forzó a las corporaciones multinacionales a ejecutar múltiples ensayos para cumplir con requerimientos de las distintas regiones. En ese contexto, la OMS, a través del National Institute of Biological Standards and Control de Gran Bretaña (NIBSC) estableció el Primer Estándar Internacional (IS-1) en 1987, a partir de una preparación purificada de LPS de *E. coli* O 113: H10: K negativo, basándose en resultados obtenidos en el ensayo de gel en tubo.

Hacia mitad de la década del 90, y reconociendo el uso creciente de método fotométricos [62,63], el NIBSC establece el IS-2 [64], actualmente vigente, a partir de la misma preparación purificada de LPS. Se le asigna una potencia de 10.000 UI/ampolla, en base a resultados de 24 laboratorios que emplearon sus técnicas y reactivos habituales y un lisado reactivo común a todos. Vale recordar que una UI se define como la actividad específica de una masa definida del Patrón Internacional vigente.

El lote H de la USP (USP RSE), el lote vigente de la farmacopea europea (BRP 5) y el IS-3- OMS (actualmente vigentes) son sublotes de la misma preparación de endotoxinas. Por esta razón una unidad internacional es equivalente a una unidad de endotoxinas (UE) tal como figura en USP y en JP. Sólo la Ph Eur refiere a 1 UI en su monografía [3, 64, 65].
Para los ensayos de rutina, se acepta el empleo de estándares secundarios o de trabajo [66,67]. En nuestra FNA actualmente vigente, para referirse a ellos, se emplean las siglas CSE del nombre en inglés *Control Standard Endotoxin* tal como figura en el más reciente lineamiento de FDA sobre el tema[67] y como refería la USP en versiones originales antes de la armonización con JP/Ph Eur. En general, estos estándares -secundarios para nuestra legislación-son provistos por los mismos fabricantes de lisados reactivos, quienes deberán establecer fehacientemente su potencia relativa a un estándar de referencia internacional (o equivalente, tal como es el caso del lote EC-vigente de la FDA). El Certificado de análisis adjunto refiere a una **específica** combinación LAL/CSE y certifica la relación de potencias RSE/CSE, instrucciones de rehidratación y almacenamiento. Alternativamente, aunque no es habitual, podrá estandarizarse en el laboratorio. De hacerlo- tiene cierta laboriosidad-, recomendamos recurrir al lineamiento de la FDA del año 1987 [51], donde se describen el procedimiento y los cálculos.
A raíz del fenómeno LER (ver sección 6.6.), la USP está analizando otras opciones, tales como el establecimiento de un estándar de "endotoxina de ocurrencia natural" (NOE por sus siglas en inglés) calibrado frente al RSE.

6.3.3. El Agua Reactivo

El Agua Reactivo, es agua de calidad tal que pueda ser empleada como solvente, diluyente y/o extractante en el EEB y como tal no debe ser reactiva en la metodología de ensayo seleccionada.

Deberá considerarse el origen, un nivel de endotoxinas inferior a lo detectable en aquellos ensayos de muy alta sensibilidad -no se acepta el ensayo en conejos para su control-, y utilizarse una buena técnica aséptica de manipulación.

El usuario puede decidir emplear aguas disponibles comercialmente para este uso específico o prepararlas mediante técnicas apropiadas (triple destilación, ósmosis inversa).

La presencia de cantidades mínimas de endotoxinas en el agua para EEB, o en cualquier otro reactivo o material en contacto con el lisado reactivo durante el ensayo, puede escapar a la detección mientras las concentraciones sean inferiores al límite de sensibilidad del lisado reactivo. No obstante, puede aumentar la concentración de endotoxinas en la solución que contenga el producto a examinar hasta justo por encima del límite de sensibilidad y producir una reacción positiva. Esto invalidaría el EEB. El riesgo, como resulta evidente, se puede reducir controlando el Agua Reactivo con un lisado de igual o mayor sensibilidad que el que se usará durante el análisis del producto.

No descartar la presencia de posibles interferentes, no siempre de fácil reconocimiento. Inhibidores tales como aluminio, cobre, hierro y activadores tales como calcio y magnesio han sido descriptos en distintas publicaciones. Si bien es de difícil explicación, pero tal vez está relacionada a la diferencia composición de estándares de endotoxinas, el impacto de estos inhibidores puede diferir según la marca comercial y la presencia de "carriers de agua" tales como albúmina u otros, facilitando la dispersión aún en presencia de ellos. [68,69,70,71]

6.3.4. Los Equipos e Instrumentos

El EEB requerirá distintos equipos, instrumentos y consumibles, con distinto grado de complejidad según la metodología seleccionada.

De manera general, podemos citar: baños termostatizados o placas de calentamiento, pHmetros -convenientemente con microelectrodos para medir pH de la combinación lisado reactivo/muestra sin consumir excesivo lisado reactivo-, estufas para despirogenización, lectores de microplacas y softwares asociados para ensayos de punto final o cinéticos, microplacas, puntas de pipetas automáticas, pipetas automáticas, recipientes de vidrio o plásticos, heladeras, freezers, balanzas, agitador tipo Vortex, tubos libres de endotoxinas. En el marco de las buenas prácticas, habrá que asegurar calificaciones/ calibraciones de equipos e instrumentos con frecuencia predeterminada acorde a su uso.

Las endotoxinas pueden adsorberse a la superficie de los tubos o pipetas de ciertos tipos de plástico o de vidrio. También se han descripto interferencias debido a la liberación de sustancias de los materiales plásticos (microplacas, por ejemplo.) [72,73]. Por consiguiente, los materiales utilizados en el ensayo deben controlarse. Como la composición de los tubos o pipetas puede variar ligeramente de un lote a otro, se recomienda al analista repetir los ensayos al comenzar un nuevo lote de materiales o alternativamente usar datos históricos (ej. tendencia de control negativo)/ certificados de fabricantes [74].

La automatización y robótica también tienen un rol en el EEB y, recientemente, algunos sistemas de esta naturaleza se han ensayado con éxito para el análisis de un elevado número de muestras en tiempos significativamente menores que los métodos tradicionales [75].

6.4. Establecimiento de Límites de Endotoxinas

El límite de endotoxinas define la máxima concentración permitida en el artículo ensayado. Ese límite puede obtenerse de monografías farmacopeicas. Cuando éstas no existen, pueden calcularse con la fórmula K/M que apareciera en el primer lineamiento borrador de la FDA en el año 1983 y que se explica y discute en distintas publicaciones [76, 77] donde:

K es un valor fijo igual a 5 UE/kg, que representa aproximadamente la dosis piretogénica umbral en conejos y humanos, según varios estudios empleando una endotoxina estándar de referencia de *E coli 055:B5*. Para drogas de administración intratecal, el límite se reduce a 0,2 UE/kg, basándose en literatura científica que indica que, por esta vía, son menores las dosis de endotoxinas capaces de producir una respuesta febril [78], y…

M es la máxima dosis humana expresada por kg de peso en bolo o al final de la vida útil para radiofármacos, tomando 70 kg de peso como referencia o la dosis pediátrica/kg si ésta fuera superior (para la JP, el valor promedio será de 60 kg [79]). M puede expresarse en diferentes unidades según se haya expresado la dosis humana (mg, mEq, Unidad, ml) y puede extraerse de prospectos o en ocasiones, de bibliografía (máximas dosis en estudios clínicos de investigación). Ph Eur recomienda **[80]** tener en cuenta adicionales medidas de seguridad en el caso de pacientes pediátricos, desnutridos o caquécticos (ej. considerar un peso promedio de 60 kg en lugar del valor habitual de 70 kg).

M puede tomar la forma: *dosis máxima recomendada/m^2/hora/1,80 m^2/70 kg*, cuando se trate de formulaciones (habitualmente oncológicas) cuya dosis se exprese por metro cuadrado de superficie corporal. Recientemente, para estas formulaciones se ha establecido un valor de 2,5 UE/kg para el valor de K. USP simplifica el cálculo con la expresión K: 100 UI/m^2M (máxima dosis recomendada/m^2) redondeando para K el número que surge de la relación 2,5 x 70/1,80 [22,81] . Para radiofármacos y según USP, los límites se calcularán mediante las fórmulas 175/V o 14/V, para vías parenterales excepto intratecal o intratecal respectivamente, siendo V la dosis máxima recomendada – por cuerpo entero, y no por kg de peso, . Los límites según Ph Eur son equivalentes a USP aun cuando difiere la forma en que se presenta el cálculo.

En el caso de los dispositivos médicos, y para compensar la relativa ineficiencia [82] en el método de preparación de eluatos por lavado o extracción de las EB que pudieran contaminarlos, la FDA estableció un valor límite de 20 UE/unidad, comparativamente más exigente considerando las 350 UE (5 UE/kg x 70 kg) admisibles para un fármaco. Entonces, la fórmula que aplica en estos casos es: K.N/V, siendo K: 20 UE/unidad, N: número de unidades ensayadas y V: volumen total de solución de extracción/enjuague.

Los productores de IFAs o excipientes se encuentran en la necesidad de establecer límites cuando éstos serán empleados en la formulación de productos inyectables. Éstos se encuentran en monografías farmacopeicas, a veces por ser de origen vegetal o animal, por razones de buenas prácticas y exigencias de fabricantes que desean tener bajo control este aspecto, antes de iniciar el proceso productivo. Tomando en cuenta el resto de los componentes de la formulación que los incluya, se han desarrollado estrategias en el caso de múltiples ingredientes, de forma de acomodar la contribución de los mismos en el producto final de forma que este no contenga más de los 350 UE permitidas para un adulto de 70 kg, bien descriptas por algunos autores [2, 83].
A modo de ejemplo, consideremos el producto ABC, siendo B y C ingredientes inactivos con límites establecidos (1 y 0,5 UE/mg respectivamente) y A el ingrediente activo no codificado. La composición unitaria (que a su vez es la máxima dosis en este ejemplo) es: A: 100 mg; B: 100 mg y C: 300 mg
Se plantea la siguiente fórmula para el cálculo del límite aceptable de A en ABC:

$$350 - [100 \times 1)\ (300 \times 0{,}5)] / 100$$

lo cual arroja un valor de 1 UE/mg aceptable para A en esta formulación y permite asegurar que el producto final no excederá el límite permitido.
Todos los ingredientes de la formulación y aquellos usados para su reconstitución o dilución - agua para inyectables, materias primas, etc.- [80] deben ser considerados, excepto tal vez alguno para el cual exista un racional claro para su exclusión. Por ejemplo, cresol es un antimicrobiano obtenido por sulfonación u oxidación de tolueno, fabricado con materiales y a temperaturas despirogenizantes y resulta improbable su contaminación post-fabricación sin agua que permita el crecimiento bacteriano.
En caso de ser necesario determinar límites para 2 o más componentes de una formulación, podrán establecerse en forma proporcional a su peso en la formulación o bien, proponer un límite aceptable para cada uno de ellos y estimar según el ejemplo anterior el restante.
Consideremos otra formulación conteniendo ABC, con 10 mg de A; 30 mg de B y 5 mg de C. Si ninguno de esos componentes tiene límite codificado o propuesto y el paciente recibirá 1 dosis como máximo por hora, el límite para cada componente será:

$$A: (10 \times 350) / 45$$
$$B: (30 \times 350) / 45$$
$$C: (5 \times 350) / 45$$

Si el componente cuyo límite se establece mediante alguna de las formas anteriores se encuentra en 2 o más formulaciones (ejemplo: un excipiente), el valor más exigente será el que se utilizará para establecer el límite de EB [80].
Por otro lado, convenientemente el laboratorio debería establecer límites de alerta para producto terminado y límites inferiores para graneles (solución para liofilizar por ejemplo.) o activos farmacéuticos (codificados o no) de forma de contar con un cierto margen de seguridad frente al valor máximo tolerado del producto terminado al que darán origen.

6.5. Máxima dilución válida

La dilución con Agua Reactivo u otro diluyente apropiado, como se discutirá más adelante, es la práctica aceptable más simple para superar la presencia de “interferencias” que pudieran afectar. Sin embargo, la dilución de interferentes, como es obvio, también “diluye la contaminación con EB” eventualmente presente. Por esa razón, se establece un límite (Máxima Dilución Válida -MDV-), que dependerá del límite de

Endotoxinas aceptable, la concentración inicial del "producto" en la solución y la sensibilidad del ensayo empleado.

$$\frac{\text{Lím.de endotoxinas (EU/mg o UI o ml) x Concentración de la solución de la muestra (mg o UI o ml/ml)}}{\lambda\ \text{(EU/ml)}}$$

A la hora de calcular el valor de MDV y durante el proceso de validación, considerar el Límite de Endotoxina de alerta si los procedimientos internos del laboratorio han indicado su establecimiento.
Un término que, aun cuando se ha excluido en documentos armonizados, sigue siendo citado en numerosas publicaciones y libros, y que se "autodefine" es la MCV (mínima concentración válida). Corresponde a la concentración en la MDV y no necesita, a diferencia de la MDV, aclararse la concentración de solución de inicio para su estimación.

6.6. Prueba preliminar de interferencias (inhibición/activación)

Se requiere la realización de **ensayos preliminares** para detectar la presencia eventual de factores de interferencia y la información básica para diseñar su eliminación.

Algunos productos no permiten su análisis directo porque no puede ajustarse el pH de la mezcla de reacción en el rango 6,0-8,0 o porque inhiben o activan la formación del gel/turbidez o color, o no son miscibles con los reactivos.

En la práctica, se incluyen 2 series de diluciones en paralelo de un lote del artículo en estudio: una de ellas contendrá cantidades conocidas de endotoxinas, equivalente al doble de la sensibilidad del lisado-reactivo (tubos "spike" o diluciones "spiked", según el término en ingles muy usado en nuestro medio). Podrá iniciarse la serie de diluciones a partir de una solución concentrada si se trata de un activo/excipiente sólido (alejada de la MDV) o de la concentración original del producto (inyectable o solución) o de la concentración inicial tras reconstitución según indicaciones al paciente (inyectable liofilizado) u otro enfoque, según el caso y extenderse hasta la MDV.
En las técnicas de gel en tubo, se utiliza un criterio simple: se acepta como "no interferente" a una dilución de un producto cuando se comprueba que la sensibilidad del lisado en presencia del mismo es como mínimo 0,5 veces y como máximo 2 veces la sensibilidad del lisado reactivo cuando éste se encuentra solo-rigurosamente, solamente acompañado con el diluyente del producto-. O sea, la sensibilidad del lisado no difiere significativamente de su sensibilidad en ausencia del producto. En esta técnica, en la que sólo podremos superar las interferencias negativas, la muestra del producto no debe contener endotoxinas detectables. Si no fuera así, se presenta un inconveniente, mayor si se tratara de un producto nuevo y difícilmente diferenciable de un fenómeno de "activación".
Los procedimientos de eliminación de factores de interferencia no deben aumentar ni disminuir (por ejemplo, por adsorción) la cantidad de EB en el producto a examinar. El modo clásico de verificar que esta condición se cumple es aplicar los procedimientos a una muestra a la que se ha añadido una cantidad conocida de EB y, tras el procedimiento, determinar su recuperación.
En los últimos años, surgieron evidencias acerca de la baja recuperación de LPS (lipopolisacárido) (LLR por sus siglas en inglés, más apropiado que LER, según algunos autores) en ciertos productos biológicos (anticuerpos monoclonales) cuyas fórmulas contenían buffers como citratos o fosfatos y un polisorbato y estas evidencias generaron preocupación en industria y autoridades regulatorias. Esta situación puso sobre el tapete nuevamente el hecho de que LPS no es lo mismo que Endotoxina tal como se presenta en la naturaleza. LLR ocurre aún en ausencia del ingrediente activo, en producto no diluido y no se observa cuando en lugar de LPS (forma purificada), el ensayo de recuperación se ejecuta con endotoxina natural (E), obtenida en cultivos de laboratorio. [84,85,86,87].

En los métodos fotométricos, las diluciones no interferentes serán aquellas que permitan recuperar entre el 50 y el 200 % de la endotoxina agregada externamente. De esta forma, contaremos con una primera aproximación del rango de concentraciones/diluciones del producto "libre de interferencias".

Las posibles causas de interferencias y como superarlas ha sido motivo de estudio durante largo tiempo en distintas áreas de trabajo y, con mayor ahínco, durante el reemplazo del método de piretógenos en conejos por el EEB como lo indica la abundante bibliografía sobre el tema y es nuestra propia experiencia.

6.6.1. Posibles causas de interferencias

Si hubiera evidencias de interferencias, no podrá continuarse con la validación definitiva antes de plantearse cual/cuales pueden ser las posibles causas. Cooper, entre otros, señala principalmente las siguientes [88,89,90]:

- *pH de la mezcla muestra/ lisado reactivo en un rango subóptimo*. Por tratarse de una serie de reacciones enzimáticas, éste es un punto crítico y, según Cooper y nuestra experiencia, el problema más común [90,91].
- *concentraciones inadecuadas de cationes*. Los cationes divalentes son comúnmente parte de formulaciones de lisados y tanto su depleción como las altas concentraciones tienen impacto [81] (ejemplo: efecto activador de los gluconatos de calcio [92] corroborado en los primeros estudios de compatibilidad del Servicio de Ensayos de Pureza del Departamento de Productos Biológicos del INAME [93,94].
- *alta osmolaridad*. En general se puede afirmar que altas concentraciones de sales y azúcares podrán resultar inhibitorias en cualquiera de los EEB (ejemplo dextrosa al 70 %, cloruro de sodio al 5 %).
- *metales pesados*. Pueden provenir de macromoléculas de uso terapéutico (zinc, cobre, hierro) o compuestos organometálicos (cisplatino) o ser contaminantes de distintos orígenes (ejemplo: extraíbles de contenedores o dispositivos médicos) u otros (merthiolate) y presentar una respuesta inhibitoria.
- *detergentes*. Pueden afectar el estado de polimerización de EB (y su respuesta frente al ensayo LAL, por agregación o adsorción de "spikes" en controles positivos, por ejemplo).
- *Surfactantes no iónicos y componentes capaces de formar complejos metálicos -citratos/fosfatos-*. De acuerdo a especulaciones teóricas, podría estar relacionado con la formación de micelas por la presencia de polisorbato en solución de buffers con fosfatos/citratos, impidiendo la reactividad de la endotoxina frente al factor C de la cascada enzimática del lisado en un corto tiempo de incubación de la mezcla que los contiene [84,85].
- *proteínas/inhibidores de proteasas*. Las proteínas pueden unir a las EB con resultados impredecibles o sus preparaciones contener inhibidores comunes que inhiben la activación del LAL por endotoxinas. En nuestra experiencia [95], factores de coagulación VIII y IX presentaron activaciones inespecíficas sobre la enzima coagulante. Otros autores [96] han descripto similares reacciones con éstos y otros zimógenos plasmáticos humanos tales como fibrinógeno, protrombina, plasminógeno y precalicreína.
- *activación no específica de LAL*. Los reactivos convencionales generalmente contienen Factor G, que es un pro-proteasa. El Factor G es activado por (1,3)-β-D-glucanos u otras sustancias no piretogénicas, incluyendo componentes de hemodializadores de fibra hueca (Cuprophan) y materiales celulósicos de ciertos filtros usados en la industria farmoquímica, más que en fabricación de productos farmacéuticos. Se han reportado también estas activaciones inespecíficas con extractos de levaduras y hongos, algunos biológicos, carboximetilcelulosa y algodón. El factor G activado directamente activa la enzima procoagulante y causa una reacción positiva en el EEB (ver Figura 2): en el ensayo de gel en tubo, se manifiesta como reacción positiva aun no conteniendo EB contaminantes mientras que, en ensayos fotométricos, la recuperación del spike podrá superar el 200 % permitido.[97,98]

6.6.2. Búsqueda de soluciones para superar interferencias

Una serie de preguntas podrán orientar la búsqueda de soluciones para resolver el problema de interferencias o una contaminación basal que impida una validación apropiada [2,3].

- *Está frente a un problema de pH fuera de rango?*
    - Podrá probar con dilución de la muestra con agua, un buffer Tris o la adición de ácido clorhídrico/hidróxido de sodio diluido para neutralizar el pH de la muestra (si el efecto "buffer" de los lisados reactivos no fuera suficiente para llevar la mezcla lisado/ muestra al pH óptimo para el EEB).

- *Es un producto con capacidad quelante?* (EDTA, bisfosfonatos, citratos, anticoagulantes para bolsas de sangre tales como ACD y CFD Adenina [93])
    - Podrá superarse como último recurso, con diluciones o adición de cationes divalentes (ejemplo $MgCl_2$ 50 mM) para contrarrestar la acción quelante de algunos productos, si la dilución o el cambio de fabricante de lisado reactivo no es suficiente [99].
- *Posee actividad enzimática (tripsina o proteasas de serina)?* (por ej. las heparinas cálcica y sódica poseen actividad antitrombina, con efecto equivalente a la enzima coagulante)
    - Las heparinas, por ejemplo, inhiben fuertemente etapas se progelificación-gelificación pero grandes diluciones permitieron superar interferencias en el Ensayo de gel en tubo [100].
    - En Albúmina humana, que puede encontrarse en una formulación como excipiente, resultados positivos podrían interpretarse como indicadores de cierta presencia de EB. Sin embargo, podría tratarse de un "falso positivo" en concentraciones cercanas a las de uso terapéutico y ser fácilmente superables con lisado reactivo de mayor sensibilidad que permita mayores diluciones de la muestra [101].
    - Desnaturalización proteica (ejemplo 70 ºC-10 minutos), previo a la dilución, si la preparación contiene una enzima que interfiera o mimetice la acción de las EB en la cascada enzimática del lisado reactivo.
- *Puede contener un material celulósico?* (LAL RM: material reactivo en el EEB). Se reconocen a los glucanos como principales responsables por su naturaleza ubicua en IFAs o excipientes, así como su actividad inmunomoduladora. Sin embargo, las concentraciones que típicamente pueden encontrarse en preparaciones farmacéuticas no han mostrado efectos clínicos indeseables [88]. La presencia de glucanos en trazas es reconocida como fuente de resultados atípicos y de difícil interpretación, variables en resultados, entre diferentes lotes de reactivo de un mismo proveedor o con diferentes marcas comerciales.
    - Podrán emplearse lisados a los que se haya removido el factor G o buffers para reconstitución de lisado que permiten aumentar la especificidad del EEB aún en presencia de glucanos (ej buffers con CM curdlan que es un β glucano y que, en altas concentraciones, inhibe la activación del Factor G por las pequeñas cantidades de glucano que pudieran estar presentes)[98].
- *Sospecha de cambios en estado de agregación?* (ej en algunas soluciones de sales que producen agregación de la endotoxina standard y pobre recuperación de los spikes)
    - Podrá incluir agentes dispersantes comercialmente disponibles junto a dilución para superar la elevada fuerza iónica.
- *Cuál es el Peso Molecular del compuesto?* Si hubiera endotoxina endógena o interferencias y debieran ser removidas por afinidad o filtración, el PM determinará el camino a seguir.
    - La ultrafiltración a través de membranas filtrantes asimétricas de triacetato de celulosa u otras (con "cut off" apropiado de 20.000 por ejemplo) o por métodos de afinidad han demostrado ser adecuadas en la mayoría de los casos, cuando la dilución no ha sido suficiente. Con algunos agentes (alcoholes, etc.) puede ocurrir modificación de las enzimas del lisado y si no puede optarse por dilución adicional habrá que pensar en algún proceso más complejo y difícil de validar para eliminar el "agente ofensivo" (ultrafiltración por ejemplo bajo la premisa que en el ultrafiltrado se eliminan las interferencias mientras que, en el filtro, por su mayor PM permanecen las EB y entonces, podrán ser cuantificadas).

      Evidentemente, la dilución adicional de la muestra, si hubiera un margen respecto a la MDV, el empleo de lisado reactivo o técnicas con mayor sensibilidad o aún, con igual sensibilidad pero otras marcas de reactivos parecen *a priori* ser los enfoques más sencillos. Sin embargo, pueden requerirse tratamientos más complejos. Cualquiera sea el tratamiento que reciba la muestra, deberá establecerse detalladamente durante la validación y luego, efectuarse tal cual durante el ensayo rutinario (por lo cual, deberá ser lo más simple posible).

- *La muestra presenta polisorbato en buffers quelantes de cationes divalentes?*
    - Podría darse la situación de LER/LLS. Se puede sospechar de esta situación cuando los estudios de recuperación con "spike" de LPS resultan en valores menores de recuperación a medida que pasa el tiempo de almacenamiento en relación al tiempo inicial (estudios de "holding time"). La prueba definitiva de interferencias clásica no sería la más adecuada para estos casos (ver sección 6.7). [102,103] El esquema a seguir, en nuestro conocimiento, aún no se encuentra estandarizado ni es oficial. Sin embargo, y ya que ha concitado la atención internacional en la industria de los biofármacos, varias compañías farmacéuticas reunidas en un grupo denominado Biophorum Operation Group (BOP) en Estados Unidos participaron de un estudio colaborativo con un protocolo armonizado para conducir estudios de recuperación, concluyendo que aun cuando todavía no puede recomendarse para los mismos LPS o algún otro estándar de endotoxina natural (NOE), ésta parece ser la adecuada para formulaciones de estas características. En respuesta a esta necesidad, USP está proponiendo un nuevo material de referencia para estas situaciones sin intención de reemplazar al clásico estándar de referencia [102, 103].

6.7. Prueba definitiva de interferencias (inhibición/ activación)

Los elaboradores deberán, como mínimo, validar 3 lotes del producto con la dilución/concentración considerada compatible según los criterios expuestos anteriormente. En Argentina, el Laboratorio de Endotoxinas del Instituto Nacional del Medicamento, a lo largo de los años, ha seguido el criterio de efectuar las pruebas de inhibición/activación con al menos 3 marcas diferentes del mercado de un mismo producto en los muestreos periódicos de las distintas especiales medicinales.

En relación a este punto, Cooper sugiere, razonablemente, que, para la **prueba definitiva de interferencias**, la concentración compatible seleccionada no debería ser la primera concentración que permita la recuperación de 2 x λ en técnica de gelificación durante la pre-validación. Si los resultados lo permiten, la segunda o tercera dilución no interferente podrá asegurarnos que nos acercamos a recuperaciones más cercanas al 100 %. De igual modo, en técnicas fotométricas, convendrá seleccionar aquella que resulte en una recuperación más centrada respecto al rango de aceptación (es decir alrededor del 100 %). También Cooper señala que es conveniente dejar bien establecido que no será necesario chequear el pH de la mezcla lisado-reactivo lote a lote, si este aspecto ha sido adecuadamente evaluado durante las etapas de validación [104,105].

6.8. Ensayo de rutina

Como ya se indicara en otros puntos, todos los detalles (planes de muestreo, preparación de soluciones, extracción, manejo de duplicados y réplicas, etc. En la evaluación del riesgo, hay que considerar que el ensayo puede ser afectado por la interacción con ciertos componentes como Agua Reactivo, buffers, reactivo LAL. EB de referencia, condiciones de almacenamiento, como temperatura, tiempo, manejo y mezcla de las muestras, deberán encontrarse claramente descriptos en procedimientos operativos **(POEs)** que demuestren que la detección de endotoxinas es estable o válida ([80]).

6.8.1. Muestra

Cuando se trate de producto terminado, es razonable sugerir [51,67] que la técnica de muestreo y el número de unidades a ensayar estén basados en un proceso de fabricación controlado y en cumplimiento de requerimientos de sistemas de calidad, el tamaño de lote y que refleje el método de muestreo empleado durante la validación. Como mínimo se espera el ensayo sobre 3 unidades representativas del principio, medio y final del lote [67].

Las unidades (contenido de jeringas prellenadas, frascos-ampolla, ampollas, etc.) pueden ensayarse en forma individual o en mezcla de "n" unidades. Es razonable asumir que, puede existir distribución inhomogénea de endotoxinas en las unidades que componen la muestra en ensayo y, si este fuera el caso, la mezcla de las mismas puede generar una dilución del contenido inicial de endotoxinas en alguna de las unidades y en consecuencia producir un "falso" cumplimiento. Tiene sentido, en este caso, disminuir a *1/n* el valor de endotoxinas límite [2]. En esta misma línea de pensamiento, sólo recientemente

la FDA ha oficializado este enfoque-ya aplicado en nuestro medio por algunos laboratorios- admitiendo la mezcla de no más de 3 unidades, cuando se trate de soluciones acuosas [67] y señalando ciertas precauciones para la mezcla. Admite, de esta forma, la estimación de una MDV ajustada con un valor límite de endotoxinas que considere la mezcla efectuada.

Cuando se trate de activos y excipientes, asegurar la representatividad del muestreo, de acuerdo a normas: número de contenedores, distribución del punto de muestreo considerando el contenedor según el caso-polvos, por ejemplo-, prevenciones microbiológicas, etc.

En el caso del agua destilada o purificada, analizar los puntos críticos de acuerdo a las conclusiones del ejercicio de validación del sistema de producción, distribución y almacenamiento.

En el caso de dispositivos médicos, las Farmacopeas Europea y Norteamericana indican 10 unidades por lote como mínimo (3 para la preparación de eluatos por lavado y extracción).

6.8.2. Soluciones

- **Solución stock de la endotoxina de referencia y sus respectivas diluciones**

  En general se recomienda el empleo de diluciones de endotoxina de referencia tan pronto como sea posible para evitar pérdida de actividad por adsorción. Para las soluciones stock (reconstitución de RSE, CSE u otra) el tiempo aceptable de almacenamiento es mayor y deben seguirse las recomendaciones de almacenamiento y condiciones de refrigeración que indique el fabricante.

- **Solución de la muestra en estudio**

  De igual forma, la solución de la muestra en la concentración del ensayo debería analizarse tras su preparación u obtención (por ej en el caso de aguas). Tener *in mente* la adecuabilidad del contenedor y el período de almacenamiento de forma de evitar adsorciones o inactivaciones que puedan resultar en "falsos negativos" [89].

- **Otras:**

  Otras soluciones empleadas para ajuste de pH de muestra (hidróxido de sodio 0,1 m/l o ácido clorhídrico 0,1 m/l, buffer Tris), buffers bloqueantes de glucano, solución de cloruro de magnesio u otras se encontrarán disponibles comercialmente o deberán calificarse para asegurar que no posean endotoxinas detectables.

6.8.3. Ensayo

Rutinariamente, el producto, cualquiera fuera, se ensayará, en replicado en la concentración igual o inferior a la validada -dentro del rango permitido por MCV/MDV- junto a controles positivos. Estos contendrán prácticamente la misma concentración de ensayo del producto, sólo diluida en un 10% debido al agregado de un pequeñísimo volumen de endotoxina estándar concentrada para lograr en la muestra una concentración equivalente al doble de la sensibilidad declarada-y confirmada- del reactivo en uso. Esos controles positivos ofrecen un control rutinario de la ausencia de interferencias de la muestra en el momento y condiciones del ensayo y son obligatorios.

Simultáneamente se ensayarán controles negativos, con el objetivo de verificar la ausencia de concentración detectable de endotoxinas en el diluyente empleado en el ensayo (generalmente LRW) y, según se trate de ensayos límites, semicuantitativos o cuantitativos, un punto ($2\ \lambda$) o una curva de calibración completa. En los ensayos cuantitativos, habrá que constatar la adecuabilidad de la curva de calibración según criterios ya indicados y todos aquellos, que aún no farmacopeicos, permitan reducir el impacto de pequeños cambios día a día (pendiente, coeficiente de correlación, cambios en el y-intercepto, coeficientes de variación entre las réplicas de las soluciones estándar o de las muestras, alejamiento de la linealidad).

6.9. Interpretación de los resultados

Si el resultado de un Ensayo límite es negativo, indica que la concentración de endotoxinas en la muestra es inferior al límite de endotoxinas establecido y la muestra cumple con la especificación codificada o calculada. Antes de considerar un resultado fuera de especificaciones, la muestra, en los ensayos de gelificación, podrá diluirse hasta la Máxima Dilución Válida.

En ensayos semicuantitativos (gel en tubo con curva de calibración) o cuantitativos (métodos fotométricos), la concentración de endotoxinas deberá ser inferior al valor establecido. Para la conformidad de las Farmacopeas y los controles de calidad habituales, la cuestión final será saber si el valor hallado se encuentra por debajo o por encima del límite.

6.10. Aplicaciones

Numerosas monografías o capítulos generales farmacopeicos refieren al requerimiento del EEB como parte de liberación de distintos productos [106,107,108,109,110,111, 112,113,114]. Por ejemplo**:**

- Especialidades medicinales para inyección (soluciones, polvos, liofilizados, etc.), de origen sintético, semisintético o natural.
- Agua para inyectables, colirios y para productos que se administración por inhalación.
- Materias primas "calidad inyectable" (dextrosa, manitol, dextranos, antibióticos, aminoácidos, etc.)
- Insumos como envases plásticos, cierres elastoméricos y jeringas asociados a productos de uso parenteral. La prueba debe realizarse sobre eluatos preparados por extracción o lavado de una muestra representativa de los envases, tapones, jeringas, etc. en volúmenes de agua libre de EB.
- Materiales relacionados con hemodiálisis (además del agua para dilución, concentrados y /o soluciones)
- Materias primas biológicas naturales y obtenidas por tecnología ADN recombinante (hemoderivados, hormonas, factores estimulantes de la hematopoyesis, anticuerpos monoclonales, etc.).
- Excipientes calidad controlada (albúmina humana, sorbitol, polisorbatos, manitol, etc.).
- Dispositivos médicos que tengan contacto directo o indirecto con el sistema cardiovascular, linfático, fluido cerebroespinal, sets para administración de soluciones, sets de transferencia, catéteres, implantes o dispositivos de infusión o productos oftálmicos para uso intraocular (fluidos, lentes intraoculares, dispositivos para glaucoma). En este último caso, para mitigar riesgos de ocurrencia de síndrome tóxico del segmento anterior del ojo, que puede disminuir significativamente la visión y que se ha asociado a EB [113,114]
- Controles de proceso (productivos o pro-analíticos): validación de procesos de filtración y despirogenización, control de insumos y columnas de purificación, control de medios de cultivo y otros insumos para ensayos biológicos *in vitro* con cultivos celulares.
- Otros: extensivo a otras actividades donde se aplican regulaciones interdisciplinarias de elaboración de medicamentos y dispositivos médicos como elaboraciones hospitalarias nutricionales, oncológicas. En todos estos casos, es recomendable la exigencia de calidad certificada en todos los insumos tanto de las especialidades medicinales, materias primas y dispositivos médicos, así como también el seguimiento de las BPM.

Aplicaciones especiales

- **Productos biológicos naturales u obtenidos por tecnología ADN recombinante**

En las farmacopeas internacionalmente reconocidas como Ph Eur y USP, hormonas obtenidas de fluidos o productos obtenidos por recombinación genética como las gonadotropinas, insulinas, eritropoyetinas, somatotrofina, citoquinas (factores de crecimiento, interferones, interleuquinas), anticuerpos monoclonales, etc., tienen establecida una especificación para EB en producto terminado. Se destaca la

importancia de establecer también límites seguros para el IFA y, en ocasiones, también para sus intermediarios. [115.] Si se han empleado células bacterianas las EB pueden considerarse una impureza originada de la pared bacteriana y será necesario removerlas durante los procesos de purificación (por procesos de exclusión molecular, intercambio iónico o adsorbentes específicos). Si las células de origen son animales, las EB pueden encontrarse como posibles contaminantes del medio de cultivo, de nutrientes, agua, y debe considerarse su presencia durante los procesos de sanitización de equipamiento como columnas de extracción o purificación. El empleo y control de los insumos utilizados y /o con calidad certificada, como los medios de cultivo, aditivos de crecimiento, buffers, etc. será crítico.

Algunos de los productos biotecnológicos son citoquinas y, como han descripto algunos autores, los efectos de cantidades mínimas de endotoxinas pueden ocasionar confusiones clínicas y analíticas [(2)]. Es importante considerar que, en estas especialidades medicinales, las formulaciones pueden contener altas concentraciones de albúmina humana como carrier proteico o excipientes como manitoles, polisorbatos, fosfatos, lauril sulfato de sodio, potencialmente piretogénicos si no se ha controlado adecuadamente su calidad y además potencialmente interferentes como ya se discutió en sección 6.6.1. Tempranamente en el INAME [(116)], trabajando con citoquinas como Molgramostim y Lenograstim, se observaron efectos inhibitorios con algunas de las metodologías. En la actualidad, es de reconocimiento general, que la combinación de polisorbatos 20 y 80 junto con complejantes iónicos, como fosfatos sódicos y citratos, comúnmente presentes en formulaciones de medicamentos biológicos tales como anticuerpos monoclonales, enmascararían la detección de EB.

- **Vacunas**

En el caso de vacunas, la Ph Eur incluye requerimiento del ensayo para aquellas de origen ADN recombinantes como las de hepatitis e influenza y las de origen bacteriano con antígenos derivados de grupos polisacáridos como las meningocóccica y neumocócica. Para otras, recomienda la aplicación del EEB o el ensayo de piretógenos en etapas de obtención de antígenos o de las vacunas. Algunas de ellas, y en ocasiones en relación a los adyuvantes incluidos, pueden requerir especial cuidado durante las etapas de validación [(117)].

- **Hemoderivados**

Si bien desde hace muchos años, la OMS recomendaba la aplicación del EEB para los controles de proceso de hemoderivados [(118] y FDA/USP incluían en sus listados límites de endotoxinas para albúminas, gammaglobulinas y factor antihemofílico desde inicios del 90, pasaron muchos años antes que se reconociera al EEB como alternativa al ensayo de piretógenos en conejos para liberación de esta clase de productos [(119)]. En la actualidad ya se incluye en monografías de soluciones de albúmina humana, factores de coagulación VIII y IX y gamma globulinas, fibrinógeno, factor de Von Willebrand, complejo protrombínico, concentrado de antitrombina III, inhibidor alfa1 proteinasa, pool de plasma humano, inhibidor de la C1 estearasa humana.

Tanto en las actualizaciones y nuevos capítulos de Ph Eur y EMA [(119)] se justifica este uso alternativo, siempre que el fabricante cumplimente BPM, haya identificado etapas críticas de los procesos desde los materiales de partida, intermediarios, ambientes y superficies y la carga biológica, si se tratara de bacterias Gram positivas, e incluido límites de carga microbiológica/endotoxinas.

En un relevamiento [(96)] del Instituto Nacional de enfermedades infecciosas de Japón con 19 productos derivados de la sangre (inmunoglobulinas normal y antitetánica con distintos tratamientos, anti-D, factores de coagulación VIII, IX, fibrinógeno, haptoglobina, etc.), se concluyó que en todos los casos fue posible superar, mediante diluciones entre 1/2 y 1/16-con la única excepción de Antitrombina III- la presencia de factores interferentes. Sin embargo, señalaron que el empleo de marcas comerciales de lisado reactivo que también reaccionan con sustancias no piretogénicas tales como (1,3)-β-D- glucanos, produjeron resultados positivos no asociados a endotoxinas. En nuestra experiencia [(120)], una inmunoglobulina antitetánica de origen humano termotratada ha demostrado un comportamiento de potenciación en ensayo cinético turbidimétrico frente a distintos lotes de una misma marca comercial de lisado reactivo,

que se resuelve al reconstituir el lisado reactivo con un buffer específico para endotoxinas (conteniendo CM-curdlan) bloqueante de la interferencia de los glucanos o LAL RM. Según distintos autores, la diferente reactividad de los lisados frente a estos materiales puede ser importante fuente de confusión.

Entre los años 1997 a 2005, el INAME, en distintos programas de control de albúminas, inmunoglobulinas humanas, proteínas plasmáticas de origen humano mediante el EEB y/o el ensayo de piretógenos en conejo, e encontraron resultados alentadores indicativos de compatibilidad de estos productos con el EEB y en todos los casos, el "no cumplimiento" del ensayo *in vivo* se acompañó con el "no cumplimiento" del EEB [101].

- **Nuevas terapias de avanzada para uso humano** (terapia celular, somática, ingeniería de tejidos, terapias génicas-vector viral o no viral-, productos obtenidos de animales o plantas transgénicas).

Se trata de terapias multidisciplinarias con requerimientos de BPM compartidos con los IFA de biológicos, especialidades medicinales y dispositivos médicos y con las mismas recomendaciones en cuanto a la exigencia de calidad certificada en todos los insumos tanto de los procesamientos de los materiales de partida, materias primas y dispositivos médicos [121].

- **Coloides, suspensiones, drogas insolubles, liposomas**

Cuando se trate el control de coloides, suspensiones o de drogas insolubles en agua o buffers compatibles con el lisado reactivo, su solubilización con dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio, la ruptura de emulsiones puede representar un problema. Si durante la prueba preliminar de interferencias, la recuperación del "spike" se encuentra dentro de los límites aceptados, no será necesario ningún procedimiento adicional. Si se percibe una recuperación en el "borde" o se observa parte del aceite en las paredes sin recuperar, siempre puede compensarse con reducción de los límites aceptables de endotoxina. Si por el contrario hay interferencias con la metodología de ensayo disponible, algunos expertos [122,123] recomiendan, con cierta lógica, tratar una suspensión/emulsión o aceites como un dispositivo médico (dilución, agitación con vórtice en forma intermitente durante no menos de 1 hora y ensayar la fase acuosa, asumiendo que la EB irá a la fase acuosa, en caso de no estar firmemente ligada al soluto. La monografía de simeticona (aceite de silicona) es un ejemplo de un método que incluye separación de fases La adición de una cantidad conocida de estándar de endotoxina a la suspensión y la evaluación de su recuperación porcentual podrá ser un enfoque de validación a considerar. También se encuentran disponibles agentes dispersantes para emulsiones oleosas u otros productos en base a aceites, a los que luego de mezclar, centrifugar y separar ambas fases acuosa y aceite, se ensaya el contenido de endotoxinas en la fase acuosa.
Los liposomas –y tal vez en el futuro algún otro sistema nanoparticulado- han planteado otro desafío ya que "no puede asegurarse que no haya quedado atrapada la endotoxina dentro del liposoma junto al ingrediente activo", o sea, enmascaran su presencia y "dramáticamente reducen su habilidad para coagular frente al lisado reactivo". Varios autores [124,125] proponen como alternativa destruir, en primer término, los liposomas con surfactantes (ej. CHAPS 1.5 % V/V) y luego diluir las muestras. Otros [126] han analizado la adecuabilidad de los ensayos de endotoxinas clásicos para estimar la contaminación con endotoxinas en algunos sistemas nanoparticulados. De no ser posible, el ensayo de piretógenos en conejos sigue siendo una alternativa conservadora [127].

7. Selección de métodos

7.1. Reemplazo del Ensayo de Piretógenos en conejos por el método de EB

Como norma general, en cualquier monografía particular debe incluirse un solo ensayo, preferentemente el EEB en lugar del ensayo de piretógenos salvo especificación en contrario-, por considerarse que garantiza una protección igual o mejor para el paciente y no está sujeto a la diferencia de susceptibilidad/sensibilidad de la colonia de animales [128,129]. Se deberá proveer toda la información que permita concluir que el EEB puede aplicarse satisfactoriamente a la sustancia o formulación de interés (detalles de preparación de la muestra, procedimientos de eliminación de factores de interferencia si aplicara, además de datos

complementarios disponibles sobre el ensayo de piretógenos en conejos que puedan contribuir a garantizar que el reemplazo es adecuado, en ocasiones particulares).

El ensayo de liberación del producto terminado debe ser claramente preestablecido por el fabricante con la aplicación de los requerimientos regulatorios evitando la alternancia de diferentes métodos acomodados para justificar desvíos o incumplimientos de producción o control.

7.2. Distintas técnicas del EEB (ensayo LAL)

Habiéndose establecido que el ensayo será el EEB, se podrá optar por sus distintas alternativas. En el primer ensayo de EB de la USP sólo se utilizaba la gelificación como criterio de evaluación. Los métodos cuantitativos cromogénicos o turbidimétricos, de punto final o cinéticos, desarrollados más tarde, requieren una instrumentación más compleja, pero pueden automatizarse más fácilmente para analizar un gran número de muestras del mismo o diferentes productos. La elección de unos u otros está vinculada en general, a la disponibilidad de equipamiento, experiencia en el laboratorio y número de muestras. En ocasiones, otras necesidades tales como necesidad de datos cuantitativos (por ejemplo para seguir un proceso de purificación durante la síntesis de un IFA convencional o biotecnológico, seguimiento de tendencias), aspectos documentales y mayores sensibilidades para productos altamente interferentes pueden mejor posicionar a las técnicas fotométricas por sobre el ensayo de gelificación, aun cuando no hay regla general, como surge de nuestra experiencia con hemoderivados/biotecnológicos [130].

Actualmente, según criterios ICH armonizados, el método de gel en tubo sigue siendo considerado referente en caso de dudas y disputas [57].

Finalmente, para conformar requerimientos regulatorios, la cuestión final es saber si un producto medicinal o dispositivo médico u otro contiene EB en concentración superior al límite establecido.

7.3. Ensayo de piretógenos *in Vitro*

En el año 1996, Hartung describió un procedimiento alternativo para el EEB y el ensayo de piretógenos en conejos, basado en la activación de células sanguíneas (monocitos humanos) y la liberación de citoquinas (IL1, IL6 y TNF alfa), es decir, basado en el mismo mecanismo por el cual una EB/piretógeno exógeno produce sus efectos biológicos en animales y humanos [131,132,133]. Fundamentado en ese principio, la Ph Eur introdujo en el año 2010) un ensayo alternativo al que denomina MAT (test de activación de monocitos, según sus siglas en inglés) [134] Como reactivo, emplea células sanguíneas obtenidas según las Buenas Prácticas de Medicina Transfusional y requiere de técnicas asociadas de cuantificación de niveles de IL-1β producido mediante enzimoinmunoensayo. Si bien la Agencia regulatoria europea (EMA) [132,133] no justifica directamente el uso de este ensayo como alternativa para el ensayo de piretógenos de productos derivados de plasma, proporciona un número de detalles que podrían ser relevantes para tal justificación (ensayos paralelos, validación del ensayo).
En la bibliografía también se lo señala como una alternativa útil para productos oleosos [136].

8. Enfoques novedosos para la detección de EB: el ensayo de Factor C recombinante

Un enfoque novedoso para detección de EB lo ofrece un nuevo ensayo en el que el reactivo es uno de los componentes del lisado de amebocitos del *Limulus* Polyphemus: el factor C (ver Figura 1**,** esquema de la cascada). El reactivo es un Factor C recombinante (obtenido de un cangrejo herradura asiático y expresado en una línea celular de un insecto). En presencia de EB el Factor C se activa y actúa sobre un sustrato sintético acoplado a un fluorógeno, clivándolo y permitiendo su cuantificación por fluorometría (al estilo del ensayo cromogénico de punto final descripto).

En nuestro conocimiento, este ensayo no ha sido utilizado en Argentina a la fecha. Su sensibilidad estaría en el orden de la que presentan los ensayos fotométricos y no es activado por glucanos [137,138]. FDA/Ph Eur admiten su empleo bajo el paraguas de validación de métodos cuando éstos difieren de los compendiales [67,80]. Esta metodología, como otras clásicas- método cromogénico, por ejemplo, sin embargo también sufre la interferencia de formulaciones con anticuerpos monoclonales con polisorbato/quelantes [85].

9. Cuestiones de Garantía de Calidad

9.1. Calificación del analista

La técnica de EB es altamente dependiente de la habilidad del analista, quien debe tener muy claro que está haciendo, y emplear buenas técnicas asépticas-no requiere ambientes especiales con filtros de alta eficiencia para no contaminar en forma inadvertida el producto durante la preparación de la muestra o durante el ensayo.
Como lo indican las buenas prácticas, la calificación del analista debe encontrarse documentada y podrá incluir la verificación de sensibilidad declarada en un rótulo de lisado para el método de gel en tubo o la demostración del cumplimiento de parámetros de linealidad de una curva de calibración para métodos fotométricos, al estilo del ítem Procedimiento de Control de calidad del lineamiento de FDA, hoy obsoleto [51].

9.2. Calificación de equipamiento/Validación del proceso de despirogenación

Este tema excede el propósito de este capítulo.

Pero, creemos, que dado el rol del EEB, corresponde considerar en forma particular la validación del proceso de despirogenación como parte de calificación de estufas empleadas para el acondicionamiento de contenedores empleados en el ensayo, conceptos que pueden extenderse a las estufas/túneles de uso en áreas de Producción.

La despirogenización (se trate de una etapa del proceso productivo o pro-analítico) debe ser validada. En referencia al proceso de despirogenización en seco, la USP [45] indica que el desafío con piretógenos debería ser parte integral del programa de validación y a modo de ejemplo cita la inoculación de uno o más artículos a ser tratados (despirogenización) con 1.000 o más unidades de potencia de EB (ver también sección 4).

El EEB puede emplearse para demostrar una reducción de 3 unidades logarítmicas de la carga inicial, (pyroburden según el nombre en inglés) comparando la cantidad recuperada de endotoxinas en el material antes y después del tratamiento, después de elegir un ciclo, parámetros de temperatura y una configuración de carga de estufa o túnel. Debido a la dificultad propia para recuperar la endotoxina agregada a un recipiente, aun estando presente, en la práctica será necesario incorporar cantidades muy superiores a las 1.000 EU para poder calcular realmente la cantidad de endotoxina destruida y asegurar la reducción indicada.

En distintos documentos, el lector podrá ilustrarse acerca de los diferentes detalles a tener en cuenta durante este proceso, los cuales deberán estar bien definidos en procedimientos internos: número de contenedores con EB –húmedos o secos- por posición, configuraciones de carga: vacío y “peor caso de carga”, ubicación - seleccionando los “puntos más fríos-”, procedimientos para la extracción. Finalmente, el cálculo deberá relacionar el nivel de endotoxina “recuperable” en recipientes sin tratamiento (como mínimo 1.000 UE/contenedor) y el nivel de endotoxinas efectivamente recuperado al someter al ciclo de despirogenado seleccionado, para considerar si el proceso ha sido realmente efectivo [138139,140,141,142,143,144,145,146].

Criteriosamente, un enfoque similar a éste podría emplearse para otros procedimientos de despirogenización o destinados a remover /reducir carga inicial de endotoxinas.

9.3. Situaciones que requerirán nuevas pruebas de interferencias

Las pruebas de interferencia deberán repetirse en las siguientes situaciones [3]:

- Cambio de marca de lisado reactivo /CSE
- Cambio (disminución) en la sensibilidad del lisado
- Cambio en parámetros del ensayo (ejemplo, método de extracción de la muestra)
- Cambio de condiciones del ensayo (ejemplo, uso de buffers para reconstitución del lisado en lugar de agua reactivo)
- Reiterados problemas de interferencias

- Cambio de límite de endotoxinas (disminución) si durante la etapa de validación anterior la concentración a ensayar no hubiera sido contemplada
- Cambios de tipo de análisis de regresión en métodos cinéticos (regresión polinominal en lugar de la comúnmente empleada regresión lineal)
- Cambio relevante en formulación o de composición de un dispositivo médico o un envase primero/cierre
- Cambio de metodología *(*por ej. técnica de gel en tubo por técnica fotométrica).
- Cambios en procesos de fabricación o formulación del producto. Considerando que el control de recuperación del "spike" es rutinario, con cada ensayo, este podría considerarse como reaseguro /verificación cotidiana en caso de cambios menores en formulación y proceso.

9.4. Resultados fuera de especificaciones (OOS) /Ensayos no válidos

En ocasiones, podemos enfrentar situaciones "fuera de control" con un producto o con el ensayo.
El establecimiento de límites de alerta, predefiniendo un nivel límite de endotoxinas más exigente al del criterio de aceptación codificado por las farmacopeas internacionalmente reconocidas o calculado siguiendo sus lineamientos, puede ser utilizado para anticipar futuros problemas o contar con un margen de seguridad mayor y obligar a investigaciones asociadas a resultados fuera de tendencia, si así lo indicaran las políticas y POEs del laboratorio de EB.

En caso de resultados fuera de especificaciones, deberá llevarse adelante una investigación que permita descartar errores propios del laboratorio, de una manera sistemática según un procedimiento *ad hoc*, en el que se incluirá la secuencia de re-ensayos e interpretaciones posibles según resultados. [147,148] Esta investigación incluirá, como mínimo, la revisión del método analítico y aseguramiento de su ejecución correcta por parte del analista, equipos e instrumentos y su calificación, controles, preparación y almacenamiento de reactivos y estándares, curvas de calibración, cálculos, muestreo y, antecedentes. Las acciones preventivas/correctivas a tomar dependerán del resultado de esta investigación y si no se identificara un error de laboratorio, se extenderá al proceso de manufactura y eventualmente al muestreo.

Si fuera el ensayo en sí mismo, el que no cumpliera con criterios de validez (controles negativos con reacción positiva, controles positivos reflejando inhibición o activación inapropiada, falta de cumplimiento de criterios de aceptación de curvas de calibración, etc.) no podrá concluirse acerca del "estado del producto". Corresponde también en este caso investigar las causas, que podrán atribuirse a una pobre ejecución del ensayo, problemas con materiales (recipientes, tubos, microplacas, tips), cambios inadvertidos en la naturaleza del producto u otros. Procedimientos operativos describiendo situaciones de no-validez más comunes, sus potenciales causas y pasos a seguir pueden simplificar la investigación cuando esto ocurra en la rutina cotidiana.

9.5 Integridad de datos

Con la emisión del lineamiento vinculado a integridad de datos por parte de la FDA [149,150], se han propuesto enfoques basados en riesgos también para el ensayo de EB, cuando los resultados se generen en forma electrónica con equipos/software (ejemplo ensayo cinético turbidimétrico) o documentados en papel (gel-clot) o híbridos. Estos enfoques refieren a la creación de datos, a su procesamiento –interpolación en una curva de calibración o cálculo manual de un promedio geométrico-, a su revisión por la unidad de garantía de calidad y al archivo (y destrucción) de datos originales.

10. Cierre

El análisis de EB es fundamental en la elaboración y control de calidad de inyectables y de otros productos enumerados en este capítulo. Debido a su impacto en la salud humana: su presencia puede causar efectos adversos serios a graves incluyendo la muerte. Desde los tempranos '80 hasta la fecha, hemos incorporado numerosos conceptos sobre la química y funcionalidad de las EB y sobre las distintas metodologías para su prevención, detección y cuantificación. Las farmacopeas internacionalmente reconocidas han armonizado los

requisitos para el ensayo y nuestra FNA lo incluyó en su última edición. Paulatinamente, las monografías fueron reemplazando el clásico ensayo de piretógenos en conejos por el EEB, con algunas pocas excepciones dentro del grupo de biológicos o formas farmacéuticas especiales. Mientras tanto, en la última década, aparece un ingenioso ensayo *in vitro* que intenta reproducir la respuesta humana a los piretógenos exógenos, recientemente incorporado a compendios.

Esperamos que, la información volcada en este capítulo resulte de utilidad para los lectores que deseen ahondar en el simple - y a su vez complejo- tema de las Endotoxinas bacterianas.

11. Agradecimientos

A los editores del libro, por la oportunidad de trasmitir la experiencia de más de 25 años con el Ensayo de Endotoxinas Bacterianas, primer ensayo biológico *in vitro* que logró reemplazar a un ensayo clásico *in vivo,* dentro del marco de las 3 R´s.

A las instituciones en las que pudimos desarrollar nuestros trabajos (INAME, Gador SA) y a nuestros actuales y ex-compañeros/ colaboradores que aportaron su trabajo o su estímulo

A quienes, desde la primera hora, nos apoyaron con consejos y abundante bibliografía y asistencia.

Y fundamentalmente, a nuestras familias por su eterna paciencia

Bibliografía

1. Bennett, IL Jr, *Introduction: approaches to the mechanisms of endotoxin action*, p xiii-xvi in M Landy and W Braun (ed.) Bacterial endotoxins. The Institute of Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey, Rahway, 1964
2. *Endotoxins. Pyrogen, LAL testing and Depyrogenation*. Kevin L Williams. Marcel Dekker Inc Second Edition, Revised and Expanded, 2001
3. *Bacterial endotoxins-test methodologies, routine monitoring and alternatives to batch testing Association for the Advancement of Medical Instrumentation* ANSI/AAMI ST72 2002/(R), 2010
4. Greisman SE and Hornick RB *Comparative pyrogen reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin*. Proc Soc Exp Biol Med 131(4): 1154-8, 1969
5. Dinarello C Interleukin *1* Reviews of infections diseases, 6, 51-95, 1984
6. Dinarello C *Interleukin 1 and the pathogenesis of the acute phase response*. The New England Journal of Medicine 311(22):1413-1418, 1984
7. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schurmann RR, Rauchaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJS and Anker SD *Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study*. The Lancet 353, May 29, 1999
8. Galanos C and Freudenberg MA *Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action* Mediators of inflammation Vol 2 (Supplement) :11-16, 1993
9. Pfeiffer R *Investigation about the Cholera Poison* Hyg. 11: 393-412, 1896
10. Centanni E, *Untersuchungen uber das Infektionsfieber-das Antitoxin des Bakterienfiebers* Dutsch Med Wochenschr 20: 270,1894
11. Raetz CRH *Minireview Bacterial Endotoxins: Extraordinary Lipids That Activate Eucaryotic Signal Transduction*, J of Bacteriology 175 (18): 5745-5753, 1993
12. Tanamoto K-*I Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin* Methods in Enzymology 236, 31-41,1994
13. Mozes T, Ben-Efraim S and Bonta IL Le*thal and non-lethal course of endotoxin shock is determined by interactions between TNF, platelet activating factor and eicosanoids* Pathol Biol (Paris) 40(8): 807-12, 1992.
14. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer A J, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M and Brade H. *Bacterial endotoxin: molecular relationship to structure to activity and function* FASEB J. 8: 217-225, 1994.
15. Novitsky T J, Schmidt-Gengenbach J and Remillard J F *Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces* J Parenter Sci Technol 40: 284-286, 1986
16. Roslansky P F, Dawson M E and Novitsky T. *Plastics, endotoxins and the Limulus Amebocyte Lysate Test* J Parenteral Science & Technology 45, 2: 83-87, 1991
17. Petsch D. and Anspach FB, *Endotoxin removal from protein solutions* J of Biotechnology, 76 (97): 119, 2000
18. Galanos C, Freudenberg MA, Luderitz O, Rietschel ET and Westphal O, *Chemical, physicochemical and biological properties of Bacterial Lipopolysaccharides*, Prog Clin Biol Res. 29: 321-32, 1979
19. Depyrogenation Technical Report Nº 7 Parenteral Drug Association Inc. 1985 –actualmente retirado)
20. Weary M and Pearson III Frederick. *A manufacturer´s guide to depyrogenation* Biopharm 1 (4): 22-29, 1988
21. Despirogenización <1228>, USP 41
22. Prueba de endotoxinas bacterianas < 85>, USP 41
23. Karbachsch, M. Steinhoff G and Monzani, H *Depyrogenation of solutions of low molecular weight substances by ultrafiltration* Drugs made in Germany 27: 45-84,1984

24. Rafiee-Tehrani M, Farrokhnia R, Falkenhagen D and Weber C *Removal of lipid A and Pseudomonas aeruginosa endotoxin from dialysis fluids by high-flux polysulfone ultrafilter (dialyzer)* PDA J Pharml Sci Tech 50 (5): 306-310,1996

25. Issekutz AC *Removal of Gram negative endotoxin from Solutions by affinity chromatography* J Immunol Methods 61: 275-281, 1983

26. Petsch D, Deckwer WD and Anspach FB Proteinase K *Digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate assay: application of endotoxin removal from cationic proteins* Analytical Biochemistry 259: 42-47, 1998

27. Nawata M, Minobe S, Hase M, Watanabe T, Sato T and Sosa T *Specific assay for endotoxin using inmobilized histidine, Limulus amoebocyte lysate and a chromogenic substrate.*J Chromatogr. 24; 597 (1-2):415-24, 1992

28. Morrison DC and Jacobs DM. *Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides immunochemistry* Immunochemistry 13: 813-838,1976

29. H. Schultz H., Weiss J, Carroll SF and Gross WL. *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an endotoxin-binding neutrophil leukocyte-granule protein with antibacterial* J. Leukoc. Biol. 69: 505–512, 2001

30. Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB Scott RW. *The role of the Bactericidal Permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin.* The J of Immunology 148: 532-537,1992

31. Nachum R, Siegel SE, Sullivan JD, Watson SW *Inactivation of endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate* J Invert Pathol 32: 51-58, 1978

32. Pérola O. Magalhães, André M. Lopes, Priscila G. Mazzola, Carlota Rangel-Yagui, Thereza C. V. Penna, Adalberto Pessoa, *Methods of endotoxin removal from biological preparations A Review*. J Pharm Sci 10(3):388-404, 2007

33. The Microbiological Update. Editor Murray Cooper16 (11) 1999

34. Giampaolo B, Fernández Gianotti T, Fraga G, Kairiyama E, Menna M. y Salas E. *Gamma radiation resistance. Bacterial Endotoxin parts I-II: preparation of endotoxin indicators for analysis of cryopreserved skin allograftsTissue Banking Latin America*. Hospital das Clínicas- Facultad de Medicina Universidad de Sao Paulo, Brazil. 2000

35. Giampaolo B, Kairiyama E; Fernández Gianotti T, Fraga G, Fara, ML y Piccoli A. 2002 *Proceso de Radioesterilización de injertos de piel. Control de Endotoxinas Bacterianas* IX Congreso de SAFyBI, 2002

36. Fernández Gianotti T, Fraga G, Kairiyama E, Giampaolo B, Menna M, Arrúa J, Lamas G, Horak C. *Radiation sterilization of criopreserved skin allografts and radiation effects on bacterial endotoxins* Second World Congress on Tissue Banking and 8th International conference of EATB Warsaw, Poland, 1999

37. Galanos C et al *Biological activities of lipid A complexed with Bovine Serum Albumins* Eur J Biochem 31 (2): 230-3, 1972

38. Niwa M et al *Alteration of Physical*, *Chemical and Biological Properties of Endotoxin by treatment with mild alkali* J Bacteriol 97 (3): 1069-1077, 1969

39. Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos de Uso humano. Disposición ANMAT Nº 3602/2018

40. Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos'' y la "Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación'' Disposición ANMAT 2372/2008

41. Buenas Prácticas de Fabricación y Control de Soluciones Parenterales de Gran volumen. Disposición ANMAT 1149/97

42. Note for guidance on quality of water for pharmaceutical use CPMP/CVMP, EMEA; May 2002

43. Water for injections, European Pharmacopoeia 9.3

44. Water for pharmaceutical uses <1231>, USP 41

45. Sterilization and sterility assurance of compendial articles <1211>, USP 41

46. Substances for pharmaceutical use <2034>, European Pharmacopoeia 9.3

47. Levin J. and Bang FB *A description of cellular coagulation* in the *Limulus* Bull Johns Hopkins Hosp 337-45, 1964

48. Cooper JF, Levin J and Wagner HN *New Rapid in Vitro test for Pyrogen in short lived radiopharmaceuticals* J Nuclear Medicine. 11: 10, 1970

49. Pearson FC, Weary ME, Sargent HE, Novitsky TJ, Lin H, Lindsay G, Berzofsky RN, Lane AL, Wilson JD, Cooper JF, Helme JE, Twohy CW, Basch HI, Rech M, Slade JW and Winegar MP. *Comparison of several control standard endotoxins to the National Reference Standard Endotoxin- an HIMA Collaborative Study* Applied and Environmental Microbiology, 50 (1): 91-93, 1985

50. Mascoli CC and Weary ME. *Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials* J Parenteral Drug Assoc 33: 81-95,1979

51. Guideline on validation of the Limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. US Food and Drug Administration: DHHS, December 1987

52. Iwanaga S, Morita T, Hande T and Nakamura S. *Chromogenic Substrats for horseshoe Crab clotting enzyme* Haemostasis 7: 183-188,1978

53. Nakamura S, Takagi T, Iwanaga S et col. *A Clottable Protein (Coagulogen) of Horseshoe Crab Hemocytes. Structural Change of Its Polypeptide Chain during Gel Formation.* J Biochem,80 (3): 649-652, 1976

54. Lindsay G, Roslansky and Novisky T Single step, *Chromogenic Limulus amebocyte Lysate Assay for endotoxin* J. Clin Microbiol 27: 947-951,1989

55. Mondelo N.; Piccinni E *Detección de endotoxinas bacterianas en productos oncológicos*. Actas de las I Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1988

56. Pharmacopoeial Forum 17: 4, 1991

57. Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts. for use in the ICH regions on Bacterial Endotoxins test general chapter ICH Q4B Annex 14, October 2012.

58. Human normal immunoglobulin, human immunoglobulin for intravenous administration and human blood coagulation factor VIII European Pharmacopoeia 6

59. Bacterial endotoxins 2.6.1.4 European Pharmacopoeia 9.3

60. Endotoxinas Bacterianas <330>Farmacopea Argentina, Séptima edición

61. Karen Zink Mc Cullough *Constructing and interpreting standard curves for quantitative BET assays*. *The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011

62. *Endotoxin Reference Standard Harmonized Serves Worldwide Community* -The Standard, nov dec 1997

63. Cooper JF *The necessity of reliable endotoxin standards* LAL times 5 (4) 1998

64. Poole, S., Dawson, P., Gaines Das, R.E. *Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study*. JI of Endotoxin Research 4 (3), 221-231, 1997.

65. *Harmonization of Endotoxin Standards and Units* LAL update 15 (4), 1997

66. BET. USP Pharmacopoeial Forum 26 (1) 85: 218, 2000

67. FDA Guidance for Industry Pyrogens and Endotoxins testing Questions and Answers-June 2012

68. Weary ME. *The USP Bacterial Endotoxin test* <85> In: USP workshops on microbiology and pharmaceutical water, San Juan, 214-218 April 1997

69. Duner KL *The importance of the quality of Water in Limulus Amebocyte Lysate Tests* PDA J of Pharm Sci Tech , 49 (3), p. 119-121, 1995

70. Dr Thye Yin, Haemachem 1992 (comunicación personal)

71. Mondelo N, García Castro F, Piccinni E. *Importancia del agua en el ensayo de detección de endotoxinas bacterianas*. Actas de las III Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1992

72. *Syringes can inhibit CSE activity* Chromogenix, 2002

73. Roslansky PF, Dawson ME and Novitsky TJ, *Plastics, endotoxins and the Limulus Amebocyte Lysate Test* J Parenter Sci Technol 45 (2), 83-87, 1991

74. Fife LA and Dawson ME *Laboratory disposables and the LAL test* LAL update 22 (1): 1-3, 2005

75. Kaszuba S, *Company sees success with automated endotoxin testing, PDA Letter, September 2017,*

76. Weary ME *Understanding and setting endotoxin limits*, Journal of Parenteral Science and Technology, 44 (1): 16-18,1990

77. Cooper J F. *Principles and applications of the Limulus test for pyrogens in parenteral drugs* Bull Parental Drug Assoc 29 (2): 122-130, 1975

78. L Bennet Jr RG Petersdorf and WR Keene. *Pathogenesis of fever: evidence for direct cerebral action of bacterial endotoxins* Trans Ass Am Physicians 70, 64-73, 1957

79. Decision of limits for Bacterial endotoxins Japanese Pharmacopoeia 2006

80. Guidelines for using the test for Bacterial Endotoxins <5.1.1.10> Ph Eur 9.0

81. Dawson M, *Recent regulatory issues concerning Bacterial Endotoxin Testing*, The review of American Pharmaceutical Business and Technology, October 24, 2013

82. Twohy CW, Duran AP, *Peeler* JT. *Extraction of bacterial endotoxin from medical devices*. J Parenter Sci Technol 40(6):287-91,1986

83. Williams K *Developing an Endotoxin Control Strategy for Parenteral Drug Substances and Excipients.* Pharm Technol September: 20-24, 1998

84. Chen J, Vinther A *Low endotoxin recovery (LER) in common biologics product* Orlando PDA Annual meeting, 2013

85. Reich J, Lang P, Grallert H, Motschmann H. *Masking of endotoxin in surfactant samples: effects on Limulus-based detection systems* Biologicals 44 (2016), 417-422

86. Bolden J, Platco C, Dubczak J, Cooper JF, and McCullough KZ. *The use of endotoxin as an analyte in biopharmaceutical product hold-time studies.* Pharm Forum. 2015; 41(5).

87. Cooper J, *LER: microbiology´s hottest urban myth* Am Pharm Rev. Nov/Dec.2015; 46-49.

88. Cooper J *Resolving LAL test interferences* PDA J Phar Sci Tech, 44 (1):13-15.1990

89. Dubczak J *Resolving LAL interferences The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, Karen Zink Mc Cullough, PDA, Bethesda, MD, USA, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011

90. Giampaolo, B *Ensayo de Endotoxinas bacterianas (Limulus test)* Revista SAFYBI. 31 (84): 61-73, 1991.

91. Michael E Dawson, *Understanding reaction basics The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, Karen Zink Mc Cullough, PDA, Bethesda, MD, USA, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011

92. Steindler K, Tsuji K and Enzinger M. *Potentiating Effect of Calcium Gluconate on the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Gelation- End point Assay for Endotoxin.* J Parenter Sci Technol 35(5): 242- 246, 1981

93. Giampaolo B, Fraga G, Pardo V, Albertengo M.E. *Efecto de los anticoagulantes en el ensayo de Endotoxinas Bacterianas. VI* Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1993

94. Giampaolo, B.N Y Araldi, H.T. *Limulus Test en el Control de Calidad*. Guía de Trabajos Prácticos Valoraciones Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad de Buenos Aires. Argentina, 198

95. Giampaolo B., Fraga G. y Albertengo M.1995 *Efectos de los concentrados de Factores VIII y IX en el ensayo de Endotoxinas Bacterianas* II Congreso Federación farmacéutica Sudamericana. VI reunión Latinoamericana de Ciencias Farmacéuticas. Santiago de Chile, Chile, 1995

96. M Ochiai, A Yamamoto, S Naito, J-I Maeyama, A Masumi, I Hamaguchi, Y Horiuchi, K Yamaguchi *Applicability of bacterial endotoxin test to various blood products by the use of endotoxin-specific lysates* Biologicals 38: 629-636, 2010

97. Roslansky PF, Novitsky TJ *Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) to LAL-reactive glucans* J Clin Microbiol, 29 (11): 2477-83, 1991

98. Cooper JF, Weary ME, Jordan FT. *The impact of non-endotoxin LAL-reactive materials on Limulus Amebocyte lysate analyzers* PDA J Pharm Sci Technol, 51 (1):2-6 ,1997

99. Mc Cullough KZ *Variability in the LAL test* J Parenter Sci Technol 44 (1): 19-21,1990

100. Giampaolo B, Fraga G, Oliva L y Albertengo ME *Efectos del TPA y las heparinas sobre el mecanismo de reacción del Limulus test II* Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis Mar del Plata, Argentina,1996

101. Fraga G, Giampaolo B. et col. *Especialidades medicinales derivadas de plasma humano: control de sustancias piretogénicas* CLAMME 2005.

102. Bolden J, Knight M, Stockman S, Omokoko *Results of harmonized endotoxin recovery study protocol evaluation by 14 BioPhorum Operations Group (BPOG) member companies* Biologicals, 48 (74-81), 2017

103. Tirumalai R *Naturally occuring endotoxin: a new reference material proposed by the US Pharmacopoeia,* American Pharmaceutical Review, posted july 29, 2016

104. Cooper JF *Validation of bacterial endotoxins test methods* LAL times, 2, 2, 1999

105. Cooper JF *Using validation to reduce LAL pH measurements* LAL times 4 (2) 1-3, 1997

106. Transfusion and infusion assemblies and similar medical devices <161> USP 41

107. Radiopharmaceuticals for PET-compounding <823>USP 41

108. Biologics <1041>USP 41

109. Biotechnology-derived articles <1045> USP 41

110. Good manufacturing practices for bulk pharmaceutical excipients <1078> USP 41

111. Water for pharmaceutical purposes <1231> USP 41

112. Injections <1> USP 41

113. Endotoxin testing recommendations for single-use intraocular ophtalmic devices-Guidance for Industry and FDA Staff. August 17,2015

114. Vijayakumar R and Sandle T *Bacterial Endotoxin contamination and testing limits in ophtalmics* European pharmaceutical review, 21 (4), 16-18, 2016

115. Bacterial endotoxins: policy for substances for pharmaceutical use, Ph Eur, 14th session, June 2014

116. Fraga H, Giampaolo B, Albertengo ME *Control de Endotoxinas Bacterianas en Productos Biológicos obtenidos por técnicas ADN recombinantes. Importancia de la expresión de Unidades*, Revista SAFYBI 38 (98) , 1999

117. Ochiai M, Yamamoto A, Toyoizumi H and Y Horluchi *Interfering effect of Diphteria-Tetanus-Acellular Pertussis combined (DTaP) vaccines on the Bacterial Endotoxin Test* Biologicals, 29: 55-58, 2001

118. WHO expert commitee on biological standardization technical report series. 43rd Report: number 840, 1994

119. Addendum on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products. EMEA CHMP/BWP/452081/2007.

120. Mondelo N (Gador SA). Comunicación personal,2011

121. Powers JL and Dawson ME *Endotoxin testing of cellular and tissue-based therapies* LAL update, 24 (1): 1-3, 2008

122. Jill Schultz, Charles River Endosafe, Comunicación personal, 2003

123. Paulsen, J and Per Michaelsen *The Limulus amebocyte lysate (LAL) assay for the detection of endotoxin in fat emulsions for total parenteral nutrition*. Acta Path microbiol scandinavica Series B: Microbiologia 92B, 1-6:177-179. 1984.

124. Piluso LG and Martinez MY *Resolving Liposomal inhibition of quantitative* LAL Methods J Pharm Sci Techn, 53 (5) : 260-263, 1999

125. Harmon P, Cabral-Lilly D, Reed R A, Maurio F. *The release and detection of endotoxin from Liposomes* Analytical Biochemistry 250: 139-146, 1997

126. Smulders S, Kaiser JP, Zuin S, Van Landuyt KL, Golanski L, Vanoirbeek J, Wick P and Hoet PHM *Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods* Part Fibre Toxicol 9: 41, 2012

127. Ensayo de piretógenos <340> Farmacopea Argentina, Séptima Edición

128. Mondelo N y Piccinni E *Respuesta febril de distintas colonias de conejos frente a una endotoxina purificada* Revista SAFyBI 31 (85): 17-23, 1991

129. Beom-Jun L and Yong-Soon L *Influence of low or high endotoxin-susceptible rabbits on pyrogen test* Korean J Toxicol 4, 2: 181-188, 1988

130. Fraga G y Giampaolo B *Sustancias piretogénicas ensayos in vivo e in vitro de endotoxinas bacterianas: métodos alternativos* Jornadas de Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Bs. As. 2008

131. Hartung T and Wendel. A *Detection of pyrogens using human whole blood In Vitro* Toxicol, 9: 353-359, 1996

132. Poole S and Gaines Das RE *Towards A "human pyrogen test"* European Journal of Parenteral Sciences, 6 (2): 6-64, 2001

133. Spreitzer I, Loschner B, Schneider CK, Hanschmann KM and Montag T *10 years of experience with alternative pyrogen tests (monocyte activation tests)* AATEX 34, Special Issue: 587-589, 2007

134. Monocyte Activation Test <2.6.30> European Pharmacopoeia 9.2

135. Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/05 rev 3). Addendum on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products (EMEA/CHMP/BWP/452081/2007)

136. Schindeler, S. Rosemberg, D. et. col. *Pyrogen testing of lipidic parenterals with a novel in vitro test-Application of the in vitro pyrogen test based on cryopreserved human whole blood*. Pharmeuropa Scientific Notes, 1: 1-7. 2006

137. Ding JL and Ho B *Endotoxin Detection-from Limulus Amebocyte Lysate to recombinant Factor C* In Wang X, Quinn PJ Eds Subcellular Biochemistry: Endotoxins, Structure, Function and Recognition Vol 53: 157-158, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York 2010

138. Bolden J and Smith K. *Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products* PDA J Pharm Sci Technology 71 (5) 405-412, 2017

139. *Bacterial endotoxin testing (BET) Depyrogenation and endotoxin recovery*. The Microbiological Update vol 12, 9, December 1994

140. Tohru Nakata *Destruction of typical endotoxins by dry heat as determined using LAL assay and pyrogen assay* PDA Jl of Parenteral Science & Technology Vol 47,5: 258-264, 1993

141. LAL Users Group. *Preparation and Use of Endotoxin Indicators for depyrogenation process studies* Journal of Parenteral Science &Technology 43 ,3, 1989

142. Tohru Nakata *Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven* Journal of Parenteral Science &Technology 48,2: 59-63, 1994

143. Hecker W, Witthauer D and Staerk. *A Validation of dry heat inactivation of bacterial endotoxins* PDA J of Parenteral Science &Technology 48 (4): 197-204, 1994

144. Novitsky T, Schmidt-Gengenbach J, Remillard J. *Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces* Journal of Parenteral Science &Technology 40 (6,): 284-285, 1986

145. *Validation of dry heat processes used for sterilization and depyrogenation* Technical Report Nº 3 Parenteral Drug Association (revised 2013)

146. Akers M J, Ketron K M, Thompson B *F value requirements for the destruction of endotoxin in the validation of dry heat sterilization/ depyrogenation cycles* Jl of Parenteral Science &Technology 36,1: 23-27, 1982

147. *Investigating OOS test results for pharmaceutical production* US DHHS CDER-FDA October 2006

148. *FDA Draft guidance for industry: investigating OOS test results for pharmaceutical production*. LAL times Dec 1998.

149. Data integrity and compliance with cGMP, FDA Guidance for industry, draft, April 2016

150. Farrington J, *Four steps to ensuring data integrity for BET* PDA letter, September 2017

Capítulo V.3

Control microbiológico de medicamentos no obligatoriamente estériles

María Cristina Fernández

Consideraciones generales

Métodos de Recuentos Microbianos

Ensayos de microorganismos específicos

Soluciones y medios de cultivos

Consideraciones generales

La diversidad y el número de microorganismos presentes en un producto no obligatoriamente estéril están influenciados por distintos factores:

- Intrínsecos a la formulación: drogas activas con acción antimicrobiana, conservadores, pH, contenido de nutrientes, actividad acuosa, presión osmótica, potencial de óxido-reducción y calidad higiénica de las materias primas empleadas, en especial las de origen natural.
- Extrínsecos: condiciones higiénicas durante la manufactura; contenido microbiano del material de empaque.

La alteración de un producto no obligatoriamente estéril puede ser ocasionada por bacterias, hongos y levaduras. Su desarrollo en la fase acuosa se pone de manifiesto por cambios de coloración, rancidez, cambio en la consistencia, cambio de pH, separación de fases de una emulsión, enturbiamiento, aparición de olores extraños, partículas o sedimento. Con el fin de obtener productos con una calidad microbiológica aceptable, con niveles bajos de microorganismos indicadores y ausencia de microorganismos objetables, es imprescindible el control microbiológico de todas las materias primas y del agua usada para fabricación y como ingrediente también debe ser controlada. La correcta limpieza de áreas y equipos, las buenas prácticas higiénicas del personal, un diseño correcto de la formulación y del proceso de fabricación minimizan el riesgo de contaminación microbiana.

A nivel nacional, en Argentina, la Disposición ANMAT 7667/10 [1] establece los límites microbiológicos para los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles.

Dada la diversidad de microorganismos contaminantes que pueden llegar a detectarse en un producto farmacéutico no obligatoriamente estéril, en caso de aislarse microorganismos no especificados en la Disposición ANMAT 7667/10, se deberá evaluar su relevancia en función de:

- la vía de administración

- la naturaleza del producto

- los pacientes a los cuales está destinado

En la Tabla 1 se detallan los límites microbiológicos para los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles de acuerdo a su vía de administración (Disposición ANMAT 7667/10).

Tabla 1. *Límites de Aceptabilidad para los productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles según la Disposición ANMAT 7667/10*

Vía de Administración	Recuento de microorganismos aerobios totales (UFC/g ó ml)	Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras (UFC/g ó ml)	Microorganismos específicos (1 g ó ml)
Vía inhalatoria (excepto Soluciones Fisiológicas para nebulizar)	10^2	10^1	Ausencia de *Staphylococcus aureus* Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* Ausencia de bacterias Gram negativas tolerantes a la bilis
Vías: - oromucosal - cutánea - gingival - nasal - auricular - parches trans-dérmicos (límites para un parche incluyendo la capa adhesiva y el soporte)	10^2	10^1	Ausencia de *Staphylococcus aureus* Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*
Vía vaginal	10^2	10^1	Ausencia de *Staphylococcus aureus* Ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* Ausencia de *Candida albicans*
Preparaciones acuosas para uso oral	10^2	10^1	Ausencia de *Escherichia coli*
Preparaciones no acuosas para uso oral	10^3	10^2	Ausencia de *Escherichia coli*
Vía rectal	10^3	10^2	-
Aplicaciones sobre escaras, ulceraciones o quemaduras	Ausencia de gérmenes revivificables (g ó ml)		

A los fines de lograr una buena recuperación microbiana, es importante tener en cuenta:

- la solubilidad de la muestra y características de los componentes, las propiedades antimicrobianas y el grado de contaminación esperado.
- la presencia de conservadores en un producto puede ejercer un efecto inhibidor del crecimiento microbiano, por lo tanto se requiere su neutralización o remoción.

En la Tabla 2 se detallan los conservantes más comúnmente empleados en productos farmacéuticos no estériles y los neutralizantes recomendados

Para verificar los límites mencionados en la Tabla 1, la Disposición ANMAT 7667/10 indica que se deben utilizar los métodos armonizados según el documento ICH Q4B Anexo 4C, publicados en Farmacopea Europea - Edición 6.3 -, Farmacopea Japonesa - Edición 15 - y Farmacopea de Estados Unidos de Norteamérica - Edición 30, a excepción de la investigación de Presencia de gérmenes revivificables y de *Escherichia coli.*

Tabla 2. *Agentes neutralizantes de componentes con acción inhibitoria del desarrollo microbiano*

CONSERVADOR	NEUTRALIZANTE RECOMENDADO
Compuestos de amonio cuaternario	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Clorhexidina	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Halógenos: Hipocloritos Cloraminas Iodo-povidona	Tiosulfato de sodio 0.05%
Agentes quelantes EDTA	Dilución 1/10 a 35 ºC
Aldehídos	Dilución Bisulfito de sodio 6% Suero 0.5%
Fenoles	Dilución 1/50 Tween 20 u 80 hasta 10%
Compuestos mercuriales	Tioglicolato de sodio 0.05 al 0.1% Caldo tioglicolato
Alcoholes	Dilución 1/30- 1/50-1/100
Ácidos y ésteres orgánicos	Dilución 1/50 Tween 20 u 80 al 5%

En general se acepta que pueden usarse procedimientos microbiológicos alternativos, incluyendo métodos automatizados, siempre que haya sido demostrada su equivalencia con el método de Farmacopea.

El método de recuento en placa es el más recomendado como medida cuantitativa de microorganismos en un producto, al momento de elegir el método de recuento hay que tener en cuenta que el número más probable (NMP) es generalmente el método menos exacto para los recuentos microbianos, sin embargo, para ciertos grupos de productos con una carga microbiana muy baja, puede ser el método más apropiado.

La elección de un método se debe basar en factores tales como la naturaleza del producto y el límite requerido de microorganismos. Cualquiera que sea el método elegido debe permitir efectuar el ensayo en una muestra de tamaño suficiente para evaluar la conformidad con las especificaciones y debe establecerse la idoneidad del método elegido.

I. MÉTODOS DE RECUENTOS MICROBIANOS

Los métodos descriptos en el presente ítem son los detallados la Farmacopea Europea para el recuento de microorganismos [(2)].

I. 1. Ensayo de fertilidad, idoneidad del método de recuento y controles negativos

Debe establecerse la capacidad del ensayo para detectar microorganismos en presencia del producto a examinar y confirmarse la idoneidad de un método cada vez que se introduzca alguna modificación en la realización del ensayo, o en el producto, que pueda influir en los resultados.

I. 2. Preparación de los microorganismos de ensayo

Se recomienda utilizar suspensiones de cepas de ensayo de colecciones reconocidas prepararlas como se indica a continuación.

Es conveniente aplicar técnicas de mantenimiento de cultivo de lote de siembra (sistemas de lote de siembra) de modo que los microorganismos viables utilizados para la inoculación no hayan experimentado más de 5 pasajes a partir del lote de siembra primario original.

Cultivar por separado cada una de las cepas bacterianas y fúngicas de ensayo como se describe en la Tabla 3.

Para la preparación de las suspensiones de microorganismos es conveniente utilizar una solución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 o un tampón fosfato a pH 7,2. Para preparar la suspensión de esporas de *A. brasiliensis* puede añadirse al tampón 0,05 por ciento de polisorbato 80. Utilizar las suspensiones antes de que transcurran 2 h o 24 h si se conservan a 2-8 °C. Como alternativa a la preparación y posterior dilución de una suspensión reciente de células vegetativas de *A. brasiliensis* o *B. subtilis*, se prepara una suspensión estable de esporas y a continuación se usa para la inoculación un volumen apropiado de la misma. Esta suspensión de esporas puede mantenerse a 2-8 °C durante un periodo de tiempo validado.

I. 3. Control negativo

Para verificar las condiciones de trabajo resulta conveniente preparar un control negativo utilizando el diluyente elegido en lugar de la preparación a examinar. No se debe observar ningún crecimiento de microorganismos. Un resultado no conforme en el control negativo requiere una investigación.

I. 4. Ensayo de fertilidad de los medios de cultivo

Analizar cada lote de medio, ya sea adquirido listo para su uso o preparado a partir de un medio deshidratado o a partir de los ingredientes descritos de acuerdo a un análisis de riesgo.

Sembrar los medios de cultivo líquidos y las placas conteniendo medios de cultivo sólidos para recuento (como máximo 100 UFC) con los microorganismos indicados en la Tabla 3., utilizando una porción de caldo / placa con medio distinta para cada uno. Incubar en las condiciones descritas en la Tabla 3.

Para los medios sólidos, el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor superior a 2 del valor calculado para un inóculo normalizado. Para un inóculo recién preparado se debe observar un crecimiento de los microorganismos comparable al obtenido con un lote de medio previamente controlado y aprobado.

Los medios líquidos se pueden considerar adecuados si se observa un crecimiento claramente visible de los microorganismos comparable al obtenido con un lote de medio previamente controlado y aprobado.

I. 5. Idoneidad del método de recuento en presencia de producto.

Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra depende de las características físicas del producto a examinar. Si no se puede demostrar que es satisfactorio ninguno de los procedimientos descritos a continuación, es necesario desarrollar un procedimiento alternativo.

Productos hidrosolubles: Disolver o diluir (generalmente se prepara una dilución 1 en 10) el producto a examinar en solución tamponada de peptona-cloruro de sodio a pH 7,0, o tampón fosfato a pH 7,2, o caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Si es necesario, ajustar a pH 6-8. Puede ser necesaria la preparación de diluciones adicionales con el mismo diluyente.

Tabla 3. *Preparación y uso de los microorganismos de ensayo*

Microorganismo	Preparación de la cepa de ensayo	Ensayo de fertilidad		Idoneidad del método de recuento en presencia del producto	
		Recuento de microorganismos aerobios totales	Recuento de levaduras y mohos totales	Recuento de microorganismos aerobios totales	Recuento de levaduras y mohos totales
Staphylococcus aureus tal como: ATCC 6538; NCIMB 9518 CIP 4.83; NBRC 13276	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o caldo con hidrolizado de caseína y de soja 30-35 °C 18-24 h	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja y caldo con hidrolizado de caseína y de soja ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. NMP: caldo con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-
Pseudomonas aeruginosa tal como: ATCC 9027; NCIMB 8626 CIP 82.118; NBRC 13275	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o caldo con hidrolizado de caseína y de soja 30-35 °C 18-24 h	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja y caldo con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja / NMP: caldo con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-
Bacillus subtilis tal como: ATCC 6633; NCIMB 8054 CIP 52.62; NBRC 3134	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o caldo con hidrolizado de caseína y de soja. 30-35 °C 18-24 h	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja y caldo con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja /NMP: caldo con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 3 días	-
Candida albicans tal como: ATCC 10231; NCPF 3179 IP 48.72; NBRC 1594	Agar glucosado de Sabouraud o caldo glucosado de Sabouraud. 20-25 °C 2-3 días	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 5 días	Agar-agar glucosado de Sabouraud ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5 días	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 5 días NMP: no aplicable	Agar-agar glucosado de Sabouraud. ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5 días
Aspergillus brasiliensis tal como: ATCC 16404; IMI 49007 IP 1431.83; NBRC 9455	Agar-agar Sabouraud-dextrosa o agar-agar con patata-dextrosa. 20-25 °C 5-7 días, o hasta buena esporulación	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 5 días	Agar-agar Sabouraud-dextrosa. ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5 días	Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. ≤ 100 UFC 30-35 °C ≤ 5 días NMP: no aplicable	Agar-agar Sabouraud-dextrosa. ≤ 100 UFC 20-25 °C ≤ 5 días

Productos de naturaleza no lipídica insolubles en agua: disolver o diluir el producto a examinar (generalmente se prepara una dilución 1 en 10) en solución tamponada de peptona-cloruro de sodio a pH 7,0, o tampón de fosfato a pH 7,2 o caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Para facilitar la suspensión de sustancias difícilmente humectables, puede añadirse un agente tensioactivo, tal como 1 g/L de polisorbato 80. Si es necesario, ajustar a pH 6-8. Puede ser necesaria la preparación de diluciones adicionales con el mismo diluyente.

Productos de naturaleza lipídica: Disolver el producto a examinar en miristato de isopropilo, esterilizado por filtración, o mezclarlo con la cantidad mínima necesaria de polisorbato 80 estéril o de otro agente tensioactivo estéril no inhibidor, calentado si es necesario a una temperatura no superior a 40 °C, o en casos excepcionales a una temperatura no superior a 45 °C. Mezclar cuidadosamente y, si es necesario, mantener a esa temperatura en un baño de agua. Añadir una cantidad suficiente del diluyente elegido previamente calentado para obtener una dilución 1 en 10 del producto original. Mezclar cuidadosamente mientras se mantiene la temperatura durante el tiempo mínimo necesario para la formación de una emulsión. Se pueden preparar diluciones 1/10 adicionales utilizando el diluyente elegido que contenga una concentración adecuada de polisorbato 80 estéril u otro agente tensioactivo estéril no inhibidor.

Productos líquidos o sólidos en forma de aerosol.: Transferir asépticamente el producto a un aparato de filtración por membrana o a un envase estéril. Utilizar para cada uno de los envases a examinar, el contenido total o un número definido de dosis.

Parches transdérmicos: Retirar las cubiertas protectoras (capas antiadherentes) de los parches transdérmicos y colocarlos, con el lado adherente hacia arriba, sobre bandejas de plástico o de vidrio estériles. Cubrir la superficie adherente con un material poroso estéril, por ejemplo gasa estéril, para evitar que los parches se peguen entre sí, y transferir los parches a un volumen adecuado del diluyente elegido que contiene inactivadores, tales como polisorbato 80 y/o lecitina. Agitar enérgicamente la preparación durante al menos 30 min.

I. 6. Inoculación y dilución

Añadir a la muestra preparada como se ha descrito previamente y a un control (que no contiene el producto a examinar) un volumen de la suspensión microbiana suficiente para obtener un inóculo de 100 UFC como máximo. El volumen de la suspensión del inóculo no debe ser superior al 1 % del volumen del producto diluido.

Para demostrar que la recuperación microbiana a partir del producto es aceptable, debe realizarse el ensayo sobre la muestra preparada con el factor de dilución más bajo posible. Si esto no es posible debido a la actividad antimicrobiana o a la baja solubilidad, deben aplicarse otros protocolos apropiados. Si no puede evitarse de otro modo la inhibición del crecimiento por la muestra, se puede proceder a una neutralización, dilución o filtración, antes de la adición de la alícuota de la suspensión microbiana.

I. 7. Neutralización/ eliminación de la actividad antimicrobiana

El número de microorganismos recuperados a partir de la muestra preparada, diluida e incubada como se ha descrito previamente, se debe comparar con el número de microorganismos recuperados de la preparación control.

En caso de inhibición del crecimiento (reducción en un factor mayor que 2), modificar el procedimiento a seguir para el ensayo particular de recuento para garantizar la validez de los resultados.

La modificación del procedimiento puede incluir, por ejemplo:

1) un aumento del volumen del diluyente o del medio de cultivo,

2) la incorporación al diluyente de agentes neutralizantes específicos o generales,

3) una filtración por membrana, o

4) una combinación de las modificaciones anteriores.

I. 8. Agentes neutralizantes

Estos agentes pueden utilizarse para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos (Tabla 2) añadiéndolos al diluyente elegido o al medio preferentemente antes de la esterilización. Si se utilizan, su eficacia y su ausencia de toxicidad para los microorganismos se deben demostrar preparando un blanco con neutralizante y sin producto respectivamente.

Si no se puede encontrar ningún método de neutralización adecuado, se puede suponer que la imposibilidad de aislar el organismo inoculado es debido a la actividad microbicida del producto. Esta información sirve para indicar que no es probable que el producto sea contaminado con la especie dada del microorganismo. Sin embargo, es posible que el producto sólo inhiba algunos de los microorganismos pero que no inhiba otros no incluidos entre las cepas de ensayo o para los que estas últimas no son representativas.

I. 9. Recuperación de microorganismos en presencia del producto.

Efectuar ensayos separados para cada uno de los microorganismos citados. Sólo se deben tener en cuenta los microorganismos de la cepa de ensayo añadida.

I.9.a *Filtración por membrana*.

Utilizar membranas filtrantes que tengan un tamaño de poro nominal no superior a 0,45 µm. El tipo de material filtrante se elige de tal forma que la eficacia de retención de las bacterias no se vea afectada por los componentes de la muestra a examinar. Se debe utilizar una membrana filtrante para cada microorganismo ensayado.

Transferir a la membrana filtrante una cantidad adecuada de la muestra preparada como se ha descrito en I.5, equivalente a 1 g del producto, (si se sospechan números elevados de UFC, realizar diluciones de acuerdo a la contaminación esperada), filtrar inmediatamente y lavar la membrana filtrante con un volumen apropiado de diluyente.

Para la determinación del recuento de microorganismos aerobios totales (RMAT), transferir la membrana filtrante a la superficie del agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. Para la determinación del recuento de levaduras / mohos combinados totales (RLMT), transferir la membrana a la superficie del agar-agar glucosado de Sabouraud. Incubar las placas como se indica en la Tabla 3. Efectuar el recuento.

I.9.b *Métodos de recuento en placa*.

Realizar los métodos de recuento en placa al menos por duplicado para cada medio y utilizar el valor promedio de los resultados.

I.9.b.1 Método de vertido en placa

Para placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a la placa 1 mL de la muestra preparada como se ha descrito en I.5 y 15-20 mL de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o agar-agar glucosado de Sabouraud, estando ambos medios a una temperatura no superior a 45 °C. Si se utilizan placas de Petri más grandes, la cantidad de medio de agar-agar se aumenta proporcionalmente. Para cada uno de los microorganismos citados en la Tabla 3 se usan al menos 2 placas de Petri. Incubar las placas como se indica en la Tabla 3. Obtener la media aritmética de los recuentos por medio y calcular el número de UFC en el inóculo original.

I.9.b.2 *Método de extensión en superficie*

Para placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a cada placa 15-20 mL de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o de agar-agar glucosado de Sabouraud a una temperatura de aproximadamente 45 °C y dejar que solidifique. Si se usan placas de Petri más grandes, el volumen del agar-agar se aumenta proporcionalmente. Secar las placas, por ejemplo en una cabina de flujo laminar o en una incubadora. Para cada uno de los microorganismos citados en la Tabla 3 se usan al menos 2 placas de Petri. Extender un volumen medido, no inferior a 0,1 mL

de la muestra preparada como se ha descrito en I.5 sobre la superficie del medio. Incubar y contar como se ha descrito en I.9.b.1.

I.9.b.3 *Método del número más probable (NMP)*

La precisión y la exactitud del método del NMP son inferiores a las del método de filtración por membrana y a las del método de recuento en placa. Se obtienen resultados poco fiables particularmente en el recuento de mohos. Por estas razones el método del NMP se reserva para el RMAT cuando no se dispone de ningún otro método. Si la utilización del método está justificada, proceder como sigue.

Preparar una serie de al menos 3 diluciones 1/10 del producto como se ha descrito en I.5. De cada nivel de dilución se usan 3 partes alícuotas de 1 g o 1 mL para inocular 3 tubos que contienen cada uno 9-10 mL de caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Si es necesario, se puede añadir al medio un agente tensioactivo, tal como polisorbato 80 o un inactivador de los agentes antimicrobianos. Por tanto, si se preparan 3 niveles de dilución, se siembran 9 tubos.

Incubar todos los tubos a 30-35 °C durante un máximo de 3 días. Si la lectura de los resultados es difícil o incierta debido a la naturaleza del producto a examinar, efectuar un subcultivo en el mismo caldo, o en agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja, durante 1-2 días a la misma temperatura y utilizar estos resultados. Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto a examinar a partir de la Tabla 4.

I. 10. Resultados e interpretación

Cuando se verifica la idoneidad del método de filtración por membrana o del método de recuento en placa, debe obtenerse un recuento medio de cualquiera de los organismos de ensayo que no difiera en un factor superior a 2 del valor del control. Cuando se verifica la idoneidad del método del NMP, el valor calculado a partir del inóculo debe estar entre los límites de confianza del 95 por ciento de los resultados obtenidos con el control.

Si los criterios anteriores no pueden ser cumplidos por uno o más de los microorganismos ensayados con cualquiera de los métodos descritos, se utilizan para examinar el producto el método y las condiciones de ensayo que permitan aproximarse más a dichos criterios.

I. 11. Ensayo de los productos.

I.11.a. *Cantidad de muestra a ensayar*

Salvo indicación contraria, utilizar 10 g o 10 mL del producto a examinar tomados con las precauciones mencionadas antes. Para los líquidos o sólidos en forma de aerosol, realizar la toma de muestras en 10 envases. Para parches transdérmicos, realizar la toma de muestras en 10 parches

La cantidad a examinar puede reducirse en el caso de sustancias activas que serán formuladas en las siguientes condiciones: la cantidad por unidad de dosis (por ejemplo, comprimido, cápsula, preparación inyectable) es inferior o igual a 1 mg o la cantidad por gramo o mililitro (para las preparaciones no presentadas en unidades de dosis) es inferior a 1 mg. En estos casos, la cantidad a examinar no es inferior a la cantidad presente en 10 unidades de dosis o en 10 g o 10 mL del producto.

En el caso de productos utilizados como sustancias activas en los que la cantidad de muestra es limitada o el tamaño del lote es extremadamente pequeño (esto es, inferior a 1000 mL o 1000 g), la cantidad a analizar será el 1 por ciento del lote, a menos que se haya prescrito o justificado y autorizado una cantidad menor.

En el caso de productos en los que el número total de entidades constituyentes de un lote es inferior a 200 (por ejemplo, muestras usadas en ensayos clínicos), el tamaño de la muestra puede reducirse a 2 unidades o a 1 unidad si el tamaño del lote es inferior a 100.

Seleccionar aleatoriamente la muestra o muestras del producto a granel o de los envases disponibles de la preparación. Para obtener la cantidad requerida, mezclar el contenido de un número suficiente de envases para formar la muestra.

Tabla 4. *– Valores del número más probable de microorganismos*

Combinaciones observadas del número de tubos que presentan crecimiento en cada serie			NMP por gramo o por mililitro de producto	Límites de confianza del 95 por ciento
Número de gramos o mililitros de producto por tubo				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 3	0-9,4
0	0	1	3	0,1-9,5
0	1	0	3	0,1-10
0	1	1	6,1	1,2-17
0	2	0	6,2	1,2-17
0	3	0	9,4	3,5-35
1	0	0	3,6	0,2-17
1	0	1	7,2	1,2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7,4	1,3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9,2	1,5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	2	2	35	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	90-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980
3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	> 1100	

I.11.b. *Examen del producto*

I.11.b.1 Filtración por membrana

Utilizar un aparato de filtración que permita la transferencia de la membrana al medio. Preparar la muestra utilizando un método que haya demostrado ser adecuado, y transferir la cantidad apropiada a cada una de las 2 membranas filtrantes y filtrar inmediatamente. Lavar cada filtro siguiendo el procedimiento previamente establecido.

Para la determinación del RMAT, transferir una de las membranas filtrantes a la superficie del agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. Para la determinación del RLMT, transferir la otra membrana a la superficie del agar-agar glucosado de Sabouraud. Incubar la placa de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja a 30-35 °C durante 3-5 días y la placa de agar-agar glucosado de Sabouraud a 20-25 °C durante 5-7 días. Calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto.

Para el examen de parches transdérmicos, filtrar por separado el 10 por ciento del volumen de la preparación descrita en I.5 por cada una de 2 membranas filtrantes estériles. Transferir una membrana al agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja para el RMAT y la otra membrana al agar-agar glucosado de Sabouraud para el RLMT.

I.11.b.2. Métodos de recuento en placa

- *Método de vertido en placa*

  Preparar la muestra utilizando un método que haya demostrado ser idóneo como se ha descrito previamente. Preparar al menos 2 placas de Petri para cada medio y para cada nivel de dilución. Incubar las placas de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja a 30-35 °C durante 3-5 días y las placas de agar-agar glucosado de Sabouraud a 20-25 °C durante 5-7 días. Seleccionar las placas correspondientes a una dilución dada y que presentan el mayor número de colonias inferior a 250 para el RMAT y a 50 para el RLMT. Obtener la media aritmética de los recuentos por medio de cultivo y calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto.

- *Método en superficie*

  Preparar la muestra utilizando un método que haya demostrado ser idóneo como se ha descrito previamente. Preparar al menos 2 placas de Petri para cada medio y para cada nivel de dilución. Para la incubación y el cálculo del número de UFC proceder como se ha descrito para el método de vertido en placa.

I.11.b.3. Método del número más probable

Preparar y diluir la muestra utilizando un método que haya demostrado ser idóneo como se ha descrito en el apartado 5. Incubar todos los tubos a 30-35 °C durante 3-5 días. Realizar si es necesario un subcultivo, utilizando el procedimiento previamente establecido. Para cada nivel de dilución, anotar el número de tubos que presentan crecimiento microbiano. Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto a examinar a partir de la Tabla 4.

I.11.c. *Interpretación de los resultados*

El recuento de microorganismos aerobios totales (RMAT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja; si en este medio se detectan colonias de hongos, se contabilizan como parte del RMAT. El recuento de levaduras / mohos combinados totales (RLMT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar glucosado de Sabouraud; si en este medio se detectan colonias de bacterias, se contabilizan como parte del RLMT. Si se espera que el RLMT sobrepase el criterio de aceptación debido al crecimiento bacteriano, puede usarse agar-agar glucosado de Sabouraud que contenga antibióticos. Si el recuento se efectúa por el método del NMP, el valor calculado es el RMAT.

El criterio de aceptación en materia de calidad microbiológica se interpreta como sigue:

10^1 UFC: número máximo aceptable = 20;
10^2 UFC: número máximo aceptable = 200;
10^3 UFC: número máximo aceptable = 2000, y así sucesivamente.

II. ENSAYO DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS.

Los métodos descriptos en el presente ítem son los descriptos por la Farmacopea Europea armonizada [3].

La preparación de las muestras se efectúa como se describe en el ítem de recuento de microorganismos. Si el producto a examinar posee actividad antimicrobiana debe ser, en la medida de lo posible, eliminada o neutralizada como se ha descripto en el ítem de recuento de microorganismos. Si se utilizan sustancias tensioactivas para la preparación de las muestras, debe demostrarse la ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con los inactivadores utilizados.

Debe establecerse la capacidad del ensayo para detectar microorganismos en presencia del producto a examinar. Debe confirmarse la idoneidad del método cada vez que se introduzca alguna modificación en la realización del ensayo, o en el producto, que pueda influir en los resultados.

II. 1. Preparación de las cepas de ensayo

Utilizar suspensiones estables provenientes de colecciones reconocidas de las cepas de ensayo. Se deben aplicar técnicas de mantenimiento del cultivo del lote de siembra (sistemas de lote de siembra) de modo que los microorganismos viables usados para la siembra hayan experimentado como máximo 5 pases a partir del lote de siembra primario original.

II.1.1. Microorganismos aerobios

Cultivar por separado cada una de las cepas bacterianas de ensayo en caldo con hidrolizado de caseína y de soja o en agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja a 30-35 °C durante 18-24 h. Cultivar por separado la cepa de ensayo de *Candida albicans* en agar-agar glucosado de Sabouraud o en caldo glucosado de Sabouraud a 20-25 °C durante 2-3 días.

— *Staphylococcus aureus*, tal como ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276;

— *Pseudomonas aeruginosa*, tal como ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275;

— *Escherichia coli*, tal como ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 o NBRC 3972;

— *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Typhimurium, tal como ATCC 14028 o, como alternativa, *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Abony, tal como NBRC 100797, NCTC 6017 o CIP 80.39 para los casos aplicables;

— *Candida albicans*, tal como ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594.

Utilizar disolución tamponada de peptona-cloruro de sodio a pH 7,0 o disolución tampón de fosfato a pH 7,2 para preparar las suspensiones problema. Utilizar las suspensiones antes de que transcurran 2 h o 24 h si están conservadas a 2-8 °C.

II.1.2 Clostridios.

Utilizar *Clostridium sporogenes*, tal como ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) o ATCC 19404 (NCTC 532 o CIP 79.03) o NBRC 14293. Cultivar la cepa clostridial de ensayo en condiciones anaerobias en un medio reforzado para clostridios a 30-35 °C durante 24-48 h. Como alternativa en la preparación y posterior dilución de una suspensión reciente de células vegetativas de *Cl. sporogenes*, se utiliza para la siembra de ensayo una suspensión estable de esporas. Esta suspensión puede mantenerse a 2-8 °C durante un periodo de tiempo validado.

II. 2. Control negativo

Para verificar las condiciones de ensayo, se realiza un control negativo usando el diluyente elegido en lugar de la preparación problema. No debe observarse crecimiento de microorganismos. Es recomendable realizar también un control negativo cuando se examinan los productos. Un mal resultado en el control negativo requiere una investigación.

II. 3. Propiedades de fertilidad e inhibición de los medios

Analizar cada lote de medio preparado para el ensayo y cada lote de medio preparado a partir de un medio deshidratado o a partir de los ingredientes descritos.

Verificar que los medios presentan las propiedades adecuadas como se describe en la Tabla 5.

- *Ensayo para determinar las propiedades de fertilidad de medios líquidos*:

  Sembrar en una porción del medio adecuado un pequeño número (como máximo 100 UFC) del microorganismo apropiado. Incubar a la temperatura especificada durante como máximo el menor periodo de tiempo especificado en el ensayo. Se observa un crecimiento claramente visible del microorganismo comparable con el obtenido anteriormente con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

- *Ensayo para determinar las propiedades de fertilidad de medios sólidos:*

  Aplicar el método de extensión en superficie, sembrando en cada placa un pequeño número (como máximo 100 UFC) del microorganismo apropiado. Incubar a la temperatura especificada durante como máximo el menor periodo de tiempo especificado en el ensayo. Se observa un crecimiento del microorganismo comparable con el obtenido anteriormente con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

- *Ensayo para determinar las propiedades de inhibición de medios líquidos o sólidos*:

  Sembrar en el medio adecuado al menos 100 UFC del microorganismo apropiado. Incubar a la temperatura especificada durante como mínimo el menor periodo de tiempo especificado en el ensayo. No se observa crecimiento del microorganismo de ensayo.

- *Ensayo para determinar las propiedades indicativas*:

  Aplicar el método de extensión en superficie, sembrando en cada placa un pequeño número (como máximo 100 UFC) del microorganismo apropiado. Incubar a la temperatura especificada durante un periodo de tiempo en el intervalo especificado en el ensayo. El aspecto y las reacciones indicadoras de las colonias son comparables con los de las obtenidas anteriormente con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

II. 4. Idoneidad del método de ensayo

Para cada producto a examinar, efectuar la preparación de la muestra tal como se describe anteriormente. Añadir cada cepa de ensayo al medio de crecimiento prescrito, en el momento de la mezcla. Sembrar individualmente las cepas de ensayo. Utilizar un número de microorganismos equivalente a como máximo 100 UFC en la preparación de ensayo ya sembrada.

Efectuar el ensayo como se ha descrito previamente realizando la incubación en el menor periodo recomendado.

Los microorganismos especificados deben ser detectados con las reacciones indicadoras descritas para cada microorganismo.

Si el producto presenta actividad antimicrobiana, debe realizarse una modificación del procedimiento de ensayo a los fines de eliminar ese efecto inhibidor.

Si no puede neutralizarse la actividad antimicrobiana de un producto dado sobre un microorganismo cuya búsqueda está prescrita, se supondrá que el microorganismo inhibido no puede estar presente en el producto.

Tabla 5. *Propiedades de fertilidad, inhibición e indicativas del crecimiento en los medios*

Ensayo	Medio	Propiedad	Cepas de ensayo
Ensayo para detectar bacterias gram-negativas resistentes a las sales biliares	Caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel	Ensayo de fertilidad	*E. coli* *P. aeruginosa*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar-agar con violeta cristal, rojo neutro, sales biliares y glucosa	Ensayo de fertilidad + indicación	*E. coli* *P. aeruginosa*
Ensayo para detectar *Escherichia coli*	Caldo de MacConkey	Ensayo de fertilidad	*E. coli*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar-agar de MacConkey	Ensayo de fertilidad + indicación	*E. coli*
Ensayo para detectar salmonelas	Caldo para enriquecimiento en salmonelas de Rappaport y Vassiliadis	Ensayo de fertilidad	*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium* o *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Abony*
		Inhibición	*S. aureus*
	Agar-agar con xilosa, lisina y desoxicolato	Ensayo de fertilidad + indicación	*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium* o *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Abony*
Ensayo para detectar *Pseudomonas aeruginosa*	Agar-agar con cetrimida	Ensayo de fertilidad	*P. aeruginosa*
		Inhibición	*E. coli*
Ensayo para detectar *Staphylococcus aureus*	Agar-agar con manitol-sal	Ensayo de fertilidad + indicación	*S. aureus*
		Inhibición	*E. coli*
Ensayo para detectar clostridios	Medio reforzado para clostridios	Ensayo de fertilidad	*Cl. sporogenes*
	Agar-agar Columbia	Ensayo de fertilidad	*Cl. sporogenes*
Ensayo para detectar *Candida albicans*	Caldo glucosado de Sabouraud	Ensayo de fertilidad	*C. albicans*
	Agar-agar glucosado de Sabouraud	Ensayo de fertilidad + indicación	*C. albicans*

II. 5. Ensayos realizados a los productos

II.5.1 *Bacterias gram-negativas resistentes a las sales biliares*

- *Preparación de la muestra y pre-incubación*.

Preparar una muestra usando una dilución 1/10 de al menos 1 g del producto a examinar, pero usando como diluyente, caldo con hidrolizado de caseína y de soja, mezclar e incubar a 20-25 °C durante un tiempo suficiente para revivificar las bacterias pero insuficiente para permitir su multiplicación (generalmente 2 h pero no más de 5 h).

- *Ensayo para determinar la ausencia de bacterias gram-negativas resistentes a las sales biliares*

Salvo indicación prescrita, utilizar el volumen correspondiente a 1 g del producto, preparado como se ha descrito en 4-1-1, para sembrar caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel. Incubar a 30-35 °C durante 24-48 h. Realizar subcultivos sobre placas de agar-agar con violeta cristal, rojo neutro, sales biliares y glucosa. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.

El producto satisface el ensayo si no se observa crecimiento de colonias.

- *Ensayo cuantitativo*

Selección y subcultivo. Sembrar cantidades adecuadas de caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel con la preparación descrita en preparación de la muestra o diluciones de dicha preparación que contengan respectivamente 0,1 g, 0,01 g y 0,001 g (o 0,1 mL, 0,01 mL y 0,001 mL) del producto a examinar. Incubar a 30-35 °C durante 24-48 h. Realizar subcultivos de cada uno de los cultivos en una placa de agar-agar con violeta cristal, rojo neutro, sales biliares y glucosa. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.

Interpretación. El crecimiento de colonias constituye un resultado positivo. Anotar la menor cantidad del producto que da un resultado positivo y la mayor cantidad que da un resultado negativo. Determinar a partir de la Tabla 6 el número probable de bacterias.

Tabla 6. *Interpretación de los resultados*

Resultados obtenidos con una cantidad de producto de			Número más probable de bacterias por gramo o mililitro de producto
0,1 g o 0,1 mL	0,01 g o 0,01 mL	0,001 g o 0,001 mL	
+	+	+	$> 10^3$
+	+	–	$< 10^3$ y $> 10^2$
+	–	–	$< 10^2$ y > 10
–	–	–	< 10

II.5.2. *Investigación de Escherichia coli*

Agregar un volumen de una dilución de la muestra equivalente a 1 g o ml de producto a un volumen de Caldo digerido de Caseína - Soja definido por el proceso de validación. Incubar entre 30 y 35° C durante 18 a 24 hs. Finalizado el período de incubación, aislar en Agar Mac Conkey. Incubar las placas entre 30° C y 35° C durante 18 a 72 hs. De observarse desarrollo, confirmar mediante pruebas de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias o si los ensayos de identificación son negativos.

II.5.3. *Investigación de salmonelas*

- *Preparación de la muestra y pre-incubación.*

Preparar el producto a examinar, como se describe en preparación de la muestra y usar la cantidad correspondiente a como mínimo 10 g o 10 mL para sembrar una cantidad adecuada de caldo con hidrolizado de caseína y de soja, mezclar e incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.

- *Selección y subcultivo*.

Transferir 0,1 mL de caldo con hidrolizado de caseína y de soja a 10 mL de caldo para enriquecimiento en salmonelas de Rappaport y Vassiliadis e incubar a 30-35 °C durante 18-24 h. Realizar subcultivos en placas de agar con xilosa, lisina y desoxicolato (XLD). Incubar a 30-35 °C durante 18-48 h.

- *Interpretación*.

La posible presencia de salmonelas está indicada por el crecimiento de colonias rojas bien desarrolladas, con o sin centros negros, que se confirma por los ensayos de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias de los tipos descritos o sin son negativos los ensayos de confirmación de la identificación.

II.5.4. *Investigación de Pseudomonas aeruginosa*

- *Preparación de la muestra y pre-incubación*.

Preparar una muestra utilizando una dilución 1/10 de al menos 1 g del producto a examinar y usar 10 mL o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 mL para sembrar una cantidad adecuada de caldo con hidrolizado de caseína y de soja y mezclar. Para el ensayo de parches transdérmicos, filtrar el volumen de la muestra correspondiente a 1 parche de la preparación por una membrana filtrante estéril y transferir a 100 mL de caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.

- *Selección y subcultivo*.

Realizar subcultivos en una placa de agar-agar con cetrimida e incubar a 30-35 °C durante 18-72 h.

- *Interpretación*.

El crecimiento de colonias indica la posible presencia de *P. aeruginosa*, que se confirma por los ensayos de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias o si son negativos los ensayos de confirmación de la identificación.

II.5.5. *Investigación de Staphylococcus aureus*

- *Preparación de la muestra y pre-incubación*.

Preparar una muestra utilizando una dilución 1/10 de al menos 1 g del producto a examinar y usar 10 mL o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 mL para sembrar una cantidad adecuada de caldo con hidrolizado de caseína y de soja y mezclar. Para el ensayo de parches transdérmicos, filtrar el volumen de la muestra correspondiente a 1 parche por una membrana filtrante estéril y transferir a 100 mL de caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Incubar a 30-35 °C durante 18-24 h.

- *Selección y subcultivo*.

Realizar subcultivos en una placa de agar-agar con manitol-sal e incubar a 30-35 °C durante 18-72 h.

- *Interpretación*.

La posible presencia de *S. aureus* está indicada por el crecimiento de colonias amarillas / blancas rodeadas de una zona amarilla, que se confirma por los ensayos de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan colonias de los tipos descritos o si son negativos los ensayos de confirmación de la identificación.

II.5.6. *Investigación de Clostridios*

- *Preparación de la muestra y tratamiento térmico*.

Preparar una muestra utilizando una dilución 1/10 de al menos 2 g o 2 mL del producto a examinar. Dividir la muestra en 2 porciones de al menos 10 mL. Calentar 1 porción a 80 °C durante 10 min y enfriar rápidamente. No calentar la otra porción.

- *Selección y subcultivo*.

Utilizar 10 mL o la cantidad correspondiente a 1 g o 1 mL del producto a examinar de ambas porciones para sembrar cantidades adecuadas de medio reforzado para clostridios. Incubar en condiciones anaerobias a 30-35 °C durante 48 h. Después de incubación, realizar subcultivos de cada envase en agar-agar Columbia e incubar en condiciones anaerobias a 30-35 °C durante 48-72 h.

- *Interpretación*.

El crecimiento anaerobio de bacilos (con o sin endosporas) que dan una reacción negativa a la catalasa indica la presencia de clostridios, que se confirma por los ensayos de identificación.

El producto satisface el ensayo si no se observan colonias del tipo descrito o si son negativos los ensayos de confirmación de la identificación.

II.5.7. Investigación de *Candida albicans*

- *Preparación de la muestra y pre-incubación*.

Preparar el producto a examinar y usar 10 mL o la cantidad correspondiente a no menos de 1 g o 1 mL para sembrar 100 mL de caldo glucosado de Sabouraud y mezclar. Incubar a 30-35 °C durante 3-5 días.

- *Selección y subcultivo*.

Realizar subcultivos en una placa de agar-agar glucosado de Sabouraud e incubar a 30-35 °C durante 24-48 h.

- *Interpretación*.

El crecimiento de colonias blancas puede indicar la presencia de *C. albicans*, que se confirma por ensayos de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observan dichas colonias o si son negativos los ensayos de confirmación de la identificación.

III. INVESTIGACIÓN DE PRESENCIA DE GÉRMENES REVIVIFICABLES.

Agregar un volumen de una dilución de la muestra equivalente a 1 g ó ml de producto a un volumen de Caldo digerido de Caseína - Soja definido por el proceso de validación. Incubar entre 20° C y 25° C durante al menos 5 días. Agregar otro volumen de la misma dilución equivalente a 1 g ó ml de producto a un volumen de Medio Fluido Tioglicolato definido por el proceso de validación.

Incubar entre 30° C y 35° C durante al menos 5 días.

La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de gérmenes revivificables en un gramo o mililitro si no se observa turbidez debida a desarrollo microbiano.

Los microorganismos adecuados para usar en la prueba de promoción del crecimiento de los medios de cultivo y para el ensayo de validación son los descriptos en la Tabla 6.

Tabla 6 *- Microorganismos para la prueba de promoción del crecimiento de los medios de cultivo y para el ensayo de validación*

Caldo digerido de Caseína – Soja	*Bacillus subtilis* ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134 *Candida albicans* ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455
Medio Fluido Tioglicolato	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275* *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437, NBRC 14293**

* alternativo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

** alternativo *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482

IV. DILUYENTES Y MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS

Los diluyentes y los medios de cultivo siguientes han resultado satisfactorios para aplicarlos en los ensayos de contaminación microbiana prescritos en la Farmacopea Europea [2, 3]. Pueden utilizarse otros medios siempre que pueda demostrarse su idoneidad.

Disolución tampón madre. Introducir 34 g de dihidrogenofosfato de potasio en un matraz aforado de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua purificada, ajustar a pH 7,2 ± 0,2 con hidróxido de sodio, diluir hasta 1000,0 mL con agua purificada y mezclar. Distribuir en envases y esterilizar. Conservar a 2-8 °C.

Disolución tampón de fosfato a pH 7,2. Preparar una mezcla de disolución tampón madre y agua purificada (1:800 V/V) y esterilizar.

Diluyente de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0

Dihidrogenofosfato de potasio	3,6 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	7,2 g, equivalente a fosfato 0,067 M
Cloruro de sodio	4,3 g
Peptona (de carne o caseína)	1,0 g
Agua purificada	1000 mL

Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Caldo con hidrolizado de caseína y de soja

Hidrolizado pancreático de caseína	17,0 g
Hidrolizado papaínico de soja	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hidrogenofosfato de potasio	2,5 g
Glucosa monohidrato	2,5 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja

Hidrolizado pancreático de caseína	15,0 g
Hidrolizado papaínico de soja	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar glucosado de Sabouraud

Dextrosa	40,0 g
Mezcla de hidrolizado péptico de tejido animal e hidrolizado pancreático de caseína (1:1)	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 5,6 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar con patata-dextrosa

Infusión de patatas	200 g
Dextrosa	20,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 5,6 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Caldo glucosado de Sabouraud

Dextrosa	20,0 g
Mezcla de hidrolizado péptico de tejido animal e hidrolizado pancreático de caseína (1:1)	10,0 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 5,6 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel

Hidrolizado pancreático de gelatina	10,0 g
Glucosa monohidrato	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	20,0 g
Dihidrogenofosfato de potasio	2,0 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	8,0 g
Verde brillante	15 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,2 ± 0,2 a 25 °C. Calentar a 100 °C durante 30 min y enfriar inmediatamente.

Agar-agar con violeta cristal, rojo neutro, sales biliares y glucosa

Extracto de levadura	3,0 g
Hidrolizado pancreático de gelatina	7,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Glucosa monohidrato	10,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo neutro	30 mg
Violeta cristal	2 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,4 ± 0,2 a 25 °C. Calentar a ebullición; no calentar en autoclave.

Caldo de MacConkey

Hidrolizado pancreático de gelatina	20,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Bilis de buey deshidratada	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar de MacConkey

Hidrolizado pancreático de gelatina	17,0 g
Peptonas (de carne y caseína)	3,0 g
Lactosa monohidrato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sales biliares	1,5 g

Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Violeta cristal	1 mg
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,1 ± 0,2 a 25 °C. Calentar a ebullición durante 1 min con agitación constante y luego esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Caldo para enriquecimiento en salmonelas de Rappaport y Vassiliadis

Peptona de soja	4,5 g
Cloruro de magnesio hexahidrato	29,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato de potasio	0,4 g
Dihidrogenofosfato de potasio	0,6 g
Verde malaquita	0,036 g
Agua purificada	1000 mL

Disolver calentando suavemente. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado a una temperatura no superior a 115 °C. El pH debe ser 5,2 ± 0,2 a 25 °C después de calentamiento y tratamiento en autoclave.

Agar-agar con xilosa, lisina y desoxicolato

Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactosa monohidrato	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo de fenol	80 mg
Agar-agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Citrato de amonio y hierro(III)	0,8 g
Agua purificada	1000 mL

Ajustar el pH de forma que después del calentamiento sea 7,4 ± 0,2 a 25 °C. Calentar a ebullición, enfriar hasta 50 °C y verter en placas de Petri. No calentar en autoclave.

Agar-agar con cetrimida

Hidrolizado pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato de potasio	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar-agar	13,6 g
Agua purificada	1000 mL
Glicerol	10,0 mL

Calentar a ebullición durante 1 min con agitación. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,2 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar con manitol-sal

Hidrolizado pancreático de caseína	5,0 g
Hidrolizado péptico de tejido animal	5,0 g

Extracto de vaca	1,0 g
D-Manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua purificada	1000 mL

Calentar a ebullición durante 1 min con agitación. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,4 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Medio reforzado para clostridios

Extracto de vaca	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Almidón soluble	1,0 g
Glucosa monohidrato	5,0 g
Hidrocloruro de cisteína	0,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Acetato de sodio	3,0 g
Agar-agar	0,5 g
Agua purificada	1000 mL

Hidratar el agar-agar y disolver por calentamiento a ebullición con agitación continua. En caso necesario, ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 6,8 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.

Agar-agar Columbia

Hidrolizado pancreático de caseína	10,0 g
Hidrolizado péptico de carne	5,0 g
Hidrolizado pancreático de corazón	3,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Almidón de maíz	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar-agar, según el poder gelificante	10,0-15,0 g
Agua purificada	1000 mL

Hidratar el agar-agar y disolver por calentamiento a ebullición con agitación continua. En caso necesario, ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,3 ± 0,2 a 25 °C. Esterilizar en autoclave según un ciclo validado. Dejar que se enfríe hasta 45-50 °C; añadir, si es necesario, sulfato de gentamicina correspondiente a 20 mg de gentamicina base y verter en placas de Petri.

Bibliografía

1. Disposición ANMAT 7667/2010. Boletín oficial de la República Argentina Nº 32045 pág 46. 10 de diciembre de 2010.
2. Farmacopea Europea 6.8. Capítulo 2.6.12. *Control microbiológico de productos no estériles: ensayos de recuento microbiano*.
3. Farmacopea Europea 6.8 Capítulo 2.6.13. *Control microbiológico de productos no estériles: ensayo de microorganismos específicos*.

Capítulo V.4.

Verificación de la aptitud de métodos microbiológicos

Sergio Iglesias

Introducción

Ensayo de aptitud de los métodos de control microbiológico

Ensayo preliminar

Aptitud de los ensayos de efectividad antimicrobiana

Conclusiones

Bibliografía

Introducción

El objetivo de demostrar la aptitud de los métodos microbiológicos para recuperar los microorganismos que están presentes en una muestra es confirmar que el método elegido para cuantificar o determinar la presencia o ausencia de microorganismos específicos, es adecuado y confiable. Sin esta demostración, un ensayo de esterilidad negativo, una placa de recuento con o sin colonias, o la determinación de la ausencia de un microorganismo objetable, no aseguran que el resultado que se obtiene representa la verdadera estimación de la población microbiana existente en la muestra en análisis. Esto puede deberse a que la muestra a analizar inhibe el crecimiento microbiano, o a que el método empleado interfiere o que no es el óptimo para asegurar la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra.

Es importante remarcar que, si un microorganismo se encuentra presente en una muestra, no necesariamente significa que se lo pueda detectar, ya que:

1. No existe un medio de cultivo ideal de crecimiento para todos los microorganismos existentes en una muestra.
2. Los medios y las condiciones de incubación no siempre son apropiados para todos los microorganismos que puedan estar presentes.
3. Muchos principios activos y formulaciones con presencia de inhibidores generan injuria y bacteriostasis que no permiten recuperar los microorganismos por los métodos comúnmente utilizados en el laboratorio.
4. Existen microorganismos viables no cultivables (VNC) [1 2] que incluyen tanto a microorganismos que no pueden crecer en los medios de cultivo habituales en el laboratorio, como a microorganismos que pueden ser detectados habitualmente en el laboratorio, pero circunstancialmente son expuestos a una situación de estrés (por ejemplo, estrés térmico).

Es necesario recordar que la validación de un método de ensayo involucra la determinación de parámetros como exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, robustez y repetibilidad, y que para los métodos de ensayo en los que no se puedan determinar todos estos parámetros se aplica el término “aptitud” o “adecuabilidad” en lugar de validación. Es el caso de los métodos microbiológicos tradicionales.

En el laboratorio de Microbiología de la industria farmacéutica la demostración de la aptitud de un método es apropiada para cualquier ensayo, ya sea para determinar la efectividad antimicrobiana de una formulación [3], la

carga microbiana de una muestra [4], la detección de un microorganismo específico u objetable [5], la esterilidad de un producto [6], la eficacia de un desinfectante, la efectividad de las técnicas de monitoreo ambiental, o cualquier otro ensayo descripto o no en farmacopeas.

Dado el gran espectro de métodos utilizados en Microbiología, en este capítulo describiremos la aptitud de los métodos de recuento, tanto para materias primas, productos intermedios y/o productos, la aptitud de las técnicas utilizadas para el ensayo de efectividad antimicrobiana de una formulación, la aptitud de los métodos de búsqueda de microorganismos específicos y objetables, y la aptitud de los ensayos de esterilidad.

Ensayo de aptitud de los métodos de control microbiológico

1. ¿Por qué realizarlo?

1.1- Porque está en las normas, y es exigido por las agencias e institutos de control:

- United States Pharmacopeia (USP) [4,5,6,7]
- European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) [8,9,10]
- Norma ISO 17025 (International Standarization Organization) [11]
- Norma IRAM 301 (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) [12]
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC) [13]
- Farmacopea Argentina [14]
- European Medicines Agency (EMEA) [15]
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) [16]
- Federal Drug Administration (FDA) [17, 28]
- Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) [18,19]

1.2- Porque es la única herramienta de la que se dispone para poder determinar que nuestra técnica analítica sirve para el propósito que fue diseñada y que nuestros resultados son adecuados, confiables y representan fehacientemente la calidad microbiológica de la muestra en análisis.

2. ¿Cuándo realizarlo?

2.1**-** Cuando nunca se realizó:

- Técnicas de productos y materias primas no validadas existentes en el laboratorio.
- Cada vez que deba establecerse una técnica analítica de materias primas, productos intermedios y/o productos nuevos en el laboratorio.

2.2- Cuando se modifica la formulación de un producto ya validado:

- Cambio de concentración del principio activo.
- Cambio del conservante.
- Cambio de concentración del conservante.
- Cambio de algún excipiente.
- Cambio en la relación de los conservantes y/o excipientes.

2.3- Cuando se cambian las condiciones experimentales de un método:

- Cambio de técnica de análisis (Ej., técnica de volcado en placa por técnica de filtración por membrana o viceversa)
- Cambio en la metodología (Ej., técnica de filtración por un sistema abierto a filtración empleando un sistema cerrado)
- Cambio de un medio de cultivo (Ej., cambio en la formulación de un medio, implementación de nuevos medios, etc.)
- Cambio de las condiciones de incubación

2.4- Cuando cambia una exigencia regulatoria [29]:

- Por ejemplo, a partir de la armonización de las farmacopeas respecto de la enumeración microbiana en productos no estériles, y específicamente en Argentina a partir de la Disposición 7667/10, el recuento

aeróbico total obtenido en las placas de TSA (Agar de Triptona de Soja) debe incluir el conteo de todas las colonias desarrolladas en dicho medio, por lo que el ensayo de aptitud de una técnica debe incluir cepas bacterianas, levaduras y de hongos filamentosos en este medio de cultivo.[4,9]

- Establecimiento de nuevas cepas de referencia para realizar los ensayos de aptitud. [4 5,8,9]

2.5- Cuando se deben cambiar las especificaciones de un producto por:

- Introducción del producto en mercados con diferentes requerimientos
- Cambio en la vía de administración
- Cambio de forma farmacéutica
- Estar destinado a pacientes de riesgo (pacientes oncológicos, pacientes inmunosuprimidos, población vulnerable, bebés, ancianos, etc.).

2.6- Cuando se debe implementar una nueva técnica en el laboratorio:

- Transferencia de tecnología entre laboratorios (laboratorio tercerista, casa matriz, etc.)

3. Objetivo de la determinación de la aptitud de las técnicas microbiológicas

La determinación de la aptitud de las técnicas microbiológicas se basa en la demostración de que, ni el material a ensayar, ni el ensayo al que se somete la muestra inhiben la multiplicación y/o la detección de los microorganismos que pudieran estar presentes en ella. Para ello, se debe documentar que el método utilizado, ensayado en condiciones claramente preestablecidas, cumple adecuadamente con la determinación de los parámetros para los que fue diseñado. (Ej., recuento, presencia o ausencia de microorganismos objetables y/o específicos, etc.)

Los procedimientos generales de la determinación de la aptitud de una técnica (muestreo, cantidad de muestra, cepas microbianas a utilizar, preparación de las cepas, métodos de análisis, planillas de resultados, criterios de aceptación, etc.) deben estar claramente descriptos en un procedimiento operativo estándar (POE o SOP por sus siglas en inglés de *Standard Operating Procedure*). La técnica empleada (debidamente identificada por nombre, número y versión), los nombres de los analistas que realizaron cada una de las tareas involucradas (preparación de la muestra, preparación de los inóculos, realización de la técnica, lectura de placas, realización de pasajes a medios diferenciales, etc.), los lotes de medios de cultivo, diluyentes y reactivos utilizados, los tiempos de incubación de cada etapa y los resultados obtenidos, deben estar claramente detallados en un informe final.

4. Procedimiento

Básicamente se debe desafiar la muestra con bajos niveles de inóculo de diferentes microorganismos y luego de realizar el ensayo propuesto (técnica de control microbiológico, test de esterilidad, etc.) se deben recuperar los mismos. Este procedimiento no intenta determinar el comportamiento de los microorganismos en el producto o materia prima en análisis, sino determinar que, bajo las condiciones del ensayo y siguiendo la técnica de análisis, no hay inhibición de crecimiento de los microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra.

Los factores que intervienen y deben ser considerados en el diseño de la determinación de la aptitud del ensayo microbiológico son los siguientes:

a. La naturaleza de los microorganismos usados como inóculo
b. La preparación de los inóculos
c. Las condiciones específicas del método
d. Las condiciones de recuperación de los inóculos

a) Naturaleza de los microorganismos usados como inóculo: Es fundamental el control y seguimiento de las condiciones de almacenamiento de las cepas (Origen, sistema de preservación, temperatura de almacenamiento, pureza, tipificación, número de repiques, etc.)

Los cultivos a utilizar en la determinación de la aptitud de los ensayos microbiológicos no deben exceder los 5 pasajes desde el cultivo original, ya que en cada pasaje aumenta la probabilidad de acumulación de mutaciones en el genoma bacteriano [31,32,33,34].

Nota: un pasaje es toda aquella inoculación o transferencia de un microorganismo a un medio de cultivo fresco con el fin de lograr crecimiento/multiplicación celular, no se considera un pasaje la resuspensión de microorganismos en un medio líquido (ej. un buffer) sin mediar duplicación microbiana.

Estas cepas deben proceder de centros especializados en cultivos microbianos, donde se pueda realizar la trazabilidad del origen y mantenimiento de las cepas. Por ejemplo:

ATCC: American Type Culture Collection (Estados Unidos)
CIP: Collection de Bactéries de L´ Institut Pasteur (Francia)
NCTC: National Collection of Type Cultures (Inglaterra)
IMI : International Mycological Institute (Inglaterra)
DSMZ: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulten (Alemania)

Es muy importante tener en cuenta estas consideraciones, ya que estas cepas serán los estándares de referencia y como tales no deben sufrir alteraciones durante su almacenamiento y uso. Esto asegurará que los resultados que se obtengan en la determinación de la aptitud de la técnica de análisis no serán erráticos y que serán reproducibles en cualquier laboratorio, no importando en que parte del mundo se encuentre.

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de esterilidad son: [6, 8]

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 o *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de recuento de productos no obligatoriamente estériles son: [4,9]

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de detección de microorganismos específicos de productos no obligatoriamente estériles son: [5,10]

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Salmonella enterica ATCC* 14028
- *Candida albicans ATCC 10231*
- *Clostridium sporogenes ATCC 11437*

Será de suma importancia y utilidad considerar incluir en la determinación de la aptitud de las técnicas a los microorganismos recurrentes, presentes en los aislamientos ambientales de las áreas de producción, preparación y acondicionado de los productos, como así también microorganismos habitualmente aislados en el producto y/o en los envases primarios del mismo, ya que estos microorganismos son potenciales contaminantes que la técnica de análisis debe poder recuperar e identificar. También será muy importante conocer la acción terapéutica, o bien a qué tipo de pacientes está destinado el producto para incluir microorganismos objetables asociados con la población blanco, a modo de ejemplo para un producto destinado a pacientes con fibrosis quística será muy importante incluir a *Burkholderia cepacia* en el ensayo de aptitud y en productos destinados a bebés y/o recién nacidos *incluir a Cronobacter sakazakii.*

b) Preparación de los inóculos: El estado metabólico de los inóculos es fundamental para asegurar resultados confiables y reproducibles, por lo cual hay que extremar los cuidados en la preparación y almacenamiento de las suspensiones microbianas.

Se deben estandarizar:

- los medios de cultivo para obtener los cultivos
- los diluyentes utilizados en las suspensiones microbianas
- los tiempos de crecimiento del cultivo madre
- los tiempos de almacenamiento de las suspensiones microbianas
- el material de trabajo

Para que el estado metabólico de los inóculos sea óptimo los cultivos deben ser frescos. Por ejemplo:

- Bacterias: Crecimiento en medios TSA o TSB (Trypticase Soy Agar / Broth) durante 24 horas a 30-35 ºC.
- Levaduras: Crecimiento en medio SDA (Sabouraud dextrosa agar) durante 24 horas a 3 días a 20-25 ºC.
- Hongos: Crecimiento en medio SDA durante 5 a 7 días a 20-25 ºC.

El uso de cepas liofilizadas comerciales no está contraindicado, pero no siempre se obtienen los mismos resultados que con cultivos frescos, ya que el estado metabólico de una cepa liofilizada recientemente resuspendida no es el óptimo y esto puede afectar los resultados cuando se inoculan en diluciones de productos que generen algún tipo de inhibición de crecimiento. Igualmente se podría considerar el uso de estas cepas como un peor caso.

Obtención de suspensiones de microorganismos con un recuento conocido:

Para obtener suspensiones de microorganismos con un recuento preestablecido, sin recurrir a las preparaciones comerciales, de debe partir de cultivos frescos en medios sólidos o líquidos. Estos cultivos se resuspenden en un diluyente, generalmente Peptona 0.1% o Buffer pH 7,2 [4,9], hasta una determinada densidad óptica en una longitud de onda específica. Esta longitud de onda se podría determinar realizando un espectro de absorción de cada cepa microbiana para identificar el pico máximo de absorción, y utilizar esta longitud de onda para fijar una densidad óptica que permita estandarizar una serie de sucesivas diluciones consecutivas en el mismo diluyente para obtener una suspensión de trabajo final con el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ ml) requeridas según necesidad. (Ej.: entre 10-100 UFC/ ml, 10-100 UFC/ 0.1ml, etc.). También pueden utilizarse las longitudes de onda provistas en la bibliografía. Una vez fijada la dilución con el recuento apropiado se fija a ésta como la dilución de trabajo, pudiéndose así establecer una metodología de rutina para lograr suspensiones con los recuentos necesarios.

Con respecto a las suspensiones que se utilizarán como inóculo, las farmacopeas recomiendan [4,9]:

- Usar las suspensiones dentro de las 2 horas de preparadas, o dentro de las 24 horas siguientes, si se almacenan entre 2-8 ºC. Nota: Nuestra experiencia en el laboratorio indica que algunas cepas pierden viabilidad o tienden a adherirse a las paredes del recipiente que las contiene a través del tiempo, por lo que debe validarse el dejar las soluciones bacterianas por más de dos horas aunque se mantengan entre 2-8 ºC.
- Las suspensiones de esporas (*B. subtillis* o *A. brasiliensis*) pueden conservarse entre 2-8 ºC por un período mayor, pero éste debe ser validado.

Se debe tener en cuenta que el estado metabólico de un microorganismo almacenado entre 2-8 ºC puede alterarse con el tiempo, y aunque los recuentos no varíen significativamente, la respuesta ante un producto inhibidor sí puede variar significativamente durante el almacenamiento, por lo que se recomienda utilizar siempre suspensiones frescas para evitar resultados erráticos en las repeticiones de los ensayos de aptitud.

c) Condiciones específicas del método: Se debe demostrar que el método de ensayo elegido para la estimación cuantitativa y/o cualitativa de los microorganismos es sensible, preciso y confiable en la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra. Para lo cual se debe eliminar o neutralizar cualquier propiedad antimicrobiana del producto, previamente a la evaluación de la carga microbiana de la muestra. Se detallan a continuación los métodos de neutralización de las propiedades antimicrobianas tanto del producto (principio activo y/o excipientes) como de los agentes conservadores presentes en la formulación: Neutralización química;

Neutralización enzimática, Neutralización por el agregado de cationes bivalentes, Neutralización por dilución, Neutralización por filtración y Neutralización por cambio de diluyente.

1. Neutralización por agregado de sustancias antagonistas: (Tabla I).

La neutralización química consiste en el agregado de un compuesto químico que destruya o neutralice al componente que ejerce la inhibición del crecimiento bacteriano.

La neutralización enzimática consiste en el agregado de una enzima específica que degrada al componente inhibidor

La neutralización por el agregado de cationes bivalentes es muy utilizada cuando en las preparaciones a validar se encuentran quelantes que eliminan del medio de cultivo elementos esenciales para el crecimiento bacteriano, como por ejemplo calcio y magnesio.

***Tabla I**: Neutralizantes más utilizados* [4,9,21,22,23]

Tipo de agente antimicrobiano	Neutralizante
Fenólicos	Lauril sulfato de sodio / Tween + Lecitina / Yema de huevo
Mercuriales	Tioglicolato / Tiosulfato
Halógenos	Tiosulfato
Compuestos de Amonio cuaternario	Tween + Lecitina / Yema de huevo
Ácidos orgánicos y sus ésteres	Tween / Dilución
Alcoholes	Dilución
Parabenos	Tween / Lecitina
EDTA/ Agentes quelantes	Iones Ca^{2+} / Mg^{2+} / Dilución
Aldehídos	Tiosulfato / Glicina / Dilución
Sulfonamidas	Ácido p-aminobenzoico
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Catalasa
Antibióticos β-lactámicos	β-lactamasa / Cefalosporinasa
Cloramfenicol	Cloranfenicol acetiltransferasa
Quinolonas	Cl_2Mg / β-ciclodextrinas

Entre los antagonistas, la combinación de lecitina y el tween (polisorbato) es muy utilizado como neutralizante inespecífico, y especialmente en aquellos casos en que el elemento inhibidor es liposoluble, ya que éste se reparte en la fase lipídica dejando libre la fase acuosa donde se producirá el crecimiento microbiano. A modo de ejemplo, en nuestro laboratorio un producto inhibía el desarrollo de *E. coli, S. aureus* y *C. albicans* resuspendido en TSB en dilución 1:10000, pero el agregado de lecitina y tween logró neutralizar esa inhibición permitiendo el desarrollo de *E. coli* en dilución 1:200, *S. aureus* en dilución 1:100 y *C. albicans* en dilución 1:10.

Con relación a los antibióticos betalactámicos ya existe comercialmente un neutralizante formulado con dos betalactamasas: Penicilinasa >1000 IU + Cefalosporinasa >100 IU. Esta formulación fue desarrollada para la inactivación de una amplia gama de antibióticos betalactámicos y cefalosporinas. Esta formulación fue probada en nuestro laboratorio frente a un producto que contiene cefixima (un antibiótico cefalosporínico de tercera generación) que inhibía el desarrollo de *E. coli, S. aureus, y P. aeruginosa* resuspendido en TSB en dilución 1:1000 con 1000 IU de Penicilinasa *y Salmonella* en dilución 1:10000 en las mismas condiciones de ensayo, lográndose neutralizar la inhibición con esta nueva formulación permitiendo el desarrollo de estos microorganismos en dilución 1:200.

TOXICIDAD y EFICACIA:

Se debe considerar que las propiedades antimicrobianas del agente neutralizante deben cumplir dos criterios: a) ser eficaz (EFICACIA) y b) tener baja toxicidad (TOXICIDAD) (Tabla II).

Para estimar la eficacia y la toxicidad de un neutralizante se deben evaluar los siguientes grupos de tratamientos inoculados con las cepas de análisis:

- Grupo de prueba: producto + neutralizante (eficacia del neutralizante)
- Grupo control: neutralizante + peptona (toxicidad del neutralizante)
- Grupo de viabilidad: sin producto y sin neutralizante

Tabla II *Toxicidad potencial* [23 24,30]

Neutralizante	Toxicidad potencial
Bisulfato	Células vegetativas
Glicina	Células en crecimiento
Lecitina	Bacterias
Tioglicolato	Esporas y *Staphylococcus*
Tiosulfato	*Staphylococcus*

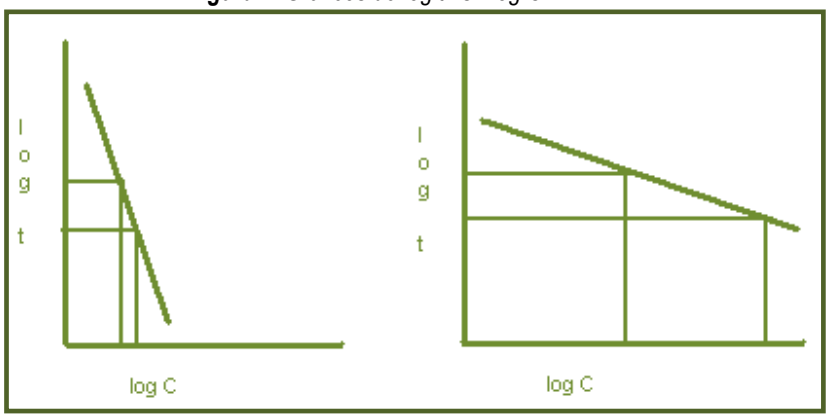
2. *Neutralización por dilución:*

La dilución es uno de los factores más simples y más efectivos a utilizar en la neutralización de sustancias inhibidoras. Esta metodología es sumamente útil cuando no se conoce un neutralizante químico o enzimático para un determinado metabolito o preparación (Tabla I). La concentración de los agentes bactericidas ejerce una influencia fundamental en su potencia. La relación entre la concentración y el efecto inhibidor de un agente antimicrobiano específico es una constante y se expresa en la siguiente fórmula:

$$C^{\eta}\, t = k$$

Donde:
C = es la concentración del agente antimicrobiano
t = es el tiempo de contacto requerido para matar un determinado inóculo
k = es una constante específica para cada agente antimicrobiano
η= es la pendiente obtenida de graficar log t versus log C

Figura 1*: Gráficos de log t vs. Log C*



En la Figura 1 se muestran dos ejemplos de gráficos de agentes antimicrobianos con distintos valores de η, en los cuales se aplica la fórmula anterior.

Los agentes antimicrobianos con valores altos de η (donde la concentración es el factor dominante) son rápidamente neutralizados por dilución, mientras que los que poseen un η bajo (donde el tiempo de contacto es el factor dominante) no son buenos candidatos para ser neutralizados por dilución. En la Tabla III se pueden observar algunos agentes antimicrobianos con sus respectivos valores de η.

Los siguientes son ejemplos de la utilización de la dilución como factor de neutralización, la cual en algunos casos permitiría recuperar los microorganismos inoculados:

- Cambio del factor de dilución de 1:10 a 1:20 o mayor, siempre que la especificación del producto lo permita.
- Cuando el cambio anterior no puede realizarse porque no lo permite la especificación del producto, una manera de mantener el límite de cuantificación (lo cual significa mantener la sensibilidad del método), es efectuar una dilución al doble, pero transfiriendo a cada placa el doble de volumen. Por ejemplo, para mantener una dilución 1:100, se puede diluir el producto a 1:200, y a partir de ésta, transferir 2 ml por placa.

Tabla III [25,27]*. Valor η para algunos agentes antimicrobianos.*

Agente	η
H_2O_2	0.5
Cloruro de Mercurio	1
Clorhexidina	2
Formaldehído	1
Etanol	9
Fenol	6
Amonios cuaternarios	0.8 – 2.5
Alcoholes alifáticos	6.0 – 12.7
Compuestos fenólicos	4 – 9.9

3. *Neutralización por filtración:*

La neutralización ejercida por el método de filtración está basada en la retención física de los microorganismos en la membrana y el pasaje del agente antimicrobiano a través de ella. Si quedara un remanente del agente inhibidor, éste puede ser eliminado con sucesivos lavados. Estos lavados pueden realizarse con o sin agregado de agentes neutralizantes. Si los lavados no son suficientes para eliminar la inhibición ejercida por el agente antimicrobiano hemos probado con éxito en nuestro laboratorio el colocar entre lavados una solución concentrada del agente neutralizante (como por ejemplo una solución concentrada de una betalactamasa o de cloruro de magnesio) en contacto con la membrana por unos minutos y luego proceder con un lavado final. Se debe tener muy en cuenta al realizar el ensayo de aptitud del método el tipo de membrana, las características del material de fabricación y la porosidad; especialmente elegir membranas con baja interacción con los productos en análisis (membranas de "bajo binding" como se las comercializa habitualmente), como así también membranas con bordes hidrófobos que evitan la acumulación de producto en los bordes al momento de efectuar la filtración. Una vez finalizado el ensayo de aptitud se deberá realizar un análisis de riesgo o realizar nuevamente otro ensayo, toda vez que se cambie el proveedor de la membrana o cambie alguna especificación del fabricante.

4. Neutralización por cambio de diluyente:

El cambio de diluyente en los ensayos de aptitud de las técnicas de análisis microbiológico no se encuentra descripto en las farmacopeas y es recomendado para aquellos productos y/o materias primas, que al momento de la dilución o resuspensión en los diluyentes o medios de cultivo líquidos, producen variaciones de pH incompatibles con el desarrollo microbiano. Algunas farmacopeas recomiendan neutralizar el pH cuando éste está alejado de 7, pero cualquier microorganismo presente en la muestra al momento de la neutralización, frente a un pH diferente podría ver seriamente afectado su sistema metabólico y su capacidad de división. Por otro lado, el agregado de bases o ácidos para llevar el pH cercano a 7 generará zonas de pH extremo al momento del goteo que posiblemente genere muerte

celular. Por lo que el autor de este capítulo recomienda en estos casos usar un diluyente con mayor capacidad reguladora, como por ejemplo utilizar la misma solución reguladora de pH descripta en las farmacopeas para análisis microbiológico, pero en mayor concentración [26]. Recordar que se debe comprobar siempre que la nueva formulación del diluyente no es tóxica, ni inhibe o afecta el crecimiento microbiano.

d) Condiciones de recuperación de los inóculos: Se deberán tener en cuenta las siguientes posibilidades de recuperación de los microorganismos: Recuperación en medio sólido (método de recuento en placa), Recuperación por filtración con membrana (ensayo de esterilidad, conteo sobre membrana, etc.) y Recuperación en medio líquido (Método de transferencia directa en ensayo de esterilidad, detección de microorganismos específicos o número más probable). A continuación se detalla cada uno:

i. ***Recuperación en medio sólido***: Se debe desafiar la muestra con bajos niveles de inóculo para demostrar la aptitud del método para recuperar bajos recuentos en el producto a ensayar. Las farmacopeas establecen que los recuentos no deben superar los 100 UFC. El autor de este capítulo recomienda que los recuentos estén dentro del rango 25 a 100 UFC, ya que por debajo de 25, el error del recuento es muy alto, afectando así la determinación del porcentaje de recuperación [7].

Cuando se evalúa la recuperación en medio sólido es importante considerar que colocando distintas alícuotas de diferentes diluciones del producto a analizar puede no modificarse la sensibilidad del método. Ver Tabla IV.

***Tabla IV**: Ensayo de sensibilidad [21]*

Dilución de la muestra	ml a plaquear (duplicados)	Promedio o UFC totales	Sensibilidad UFC/g o ml
1:10	1	Promedio	< 10
1:20	2	Promedio	< 10
1:40	4	Promedio	< 10
1:50	5	promedio	< 10

Cuando la inhibición ejercida es muy alta y no se encuentra un agente neutralizante adecuado es posible aumentar la cantidad de placas para lograr aumentar la sensibilidad del método. Se muestran en la Tabla V dos ejemplos donde la dilución de trabajo no inhibidora es 1:500 y 1:1000 respectivamente.

***Tabla V**: Aumento de cantidad de placas para mejorar la sensibilidad del método*

Dilución de la muestra	ml a plaquear por placa	Cantidad de placas	Promediar	Sensibilidad UFC/g o ml
1:500	1	10	Las 5 placas	< 100
1:1000	1	20	Las 10 placas	< 100

Otra posibilidad en estos casos es utilizar placas de 150mm de diámetro permitiendo colocar mayor volumen de muestra por placa. Se muestran nuevamente en la Tabla VI dos ejemplos donde la dilución de trabajo no inhibidora es 1:500 y 1:1000 respectivamente.

***Tabla VI**: Aumento del volumen de muestra en placas de 150 mm de diámetro para mejorar la sensibilidad del método*

Dilución de la muestra	ml a plaquear por placa	Cantidad de placas	Promediar	Sensibilidad UFC/g o ml
1:500	5	2	Las 2 placas	< 100
1:1000	10	2	Las 2 placas	< 100

En el caso en que los microorganismos de prueba tienden a crecer en forma extendida sobre el agar (Ej. *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*) se recomienda que, luego de la solidificación del medio de cultivo inoculado con los microorganismos (tanto en las placas con producto como las de control sin producto), agregar una muy delgada capa del mismo medio sin microorganismos sobre las placas así todas las colonias se desarrollarán dentro del agar sin permitir un crecimiento difuso de las colonias.

ii. ***Recuperación por filtración con membrana***: Cuando se evalúa una técnica de análisis por esta metodología, las farmacopeas [4,6,7,8,9] indican la inoculación de las suspensiones de microorganismos en el último lavado luego de la filtración del producto a analizar, lo cual permitiría evaluar que no hay restos de antimicrobianos en la membrana.Tanto autoridades de control como inspectores recomiendan el agregado de los microorganismos directamente en la solución de producto antes de filtrar, para simular el comportamiento de los microorganismos al momento del inicio del ensayo y sólo recurrir a la inoculación en el último lavado en caso de productos muy inhibidores donde no se haya conseguido neutralizarlos previamente a los lavados. Nuevamente al igual que en la metodología de recuperación en medio sólido se deberán inocular no más de 100 UFC de los microorganismos en estudio. Es necesario considerar que la recuperación por filtración con membrana puede causar por sí misma una inhibición del crecimiento bacteriano por lo que los controles positivos de recuento deben hacerse por volcado en placa.

iii. ***Recuperación en medio líquido***: Esta metodología se utiliza para el recuento por el método de número más probable (NMP) y para la investigación de microorganismos específicos. Al igual que los casos anteriores el inóculo no debe ser mayor a 100 UFC en los medios utilizados y se debe inocular las suspensiones de microorganismos una vez realizado el método de análisis. En este caso se debe considerar que el volumen del inóculo no debe superar el 1% del volumen del producto, ya que si el volumen es mayor se modificará tanto la concentración final del medio de cultivo, como del producto a evaluar y el ensayo no estaría representando la realidad.

Ensayo de aptitud del método de análisis:

Luego de haber evaluado los factores que intervienen en el diseño de la determinación de la aptitud del ensayo microbiológico, como ser la naturaleza de los microorganismos usados como inóculo, su preparación, las condiciones específicas del método y las condiciones de recuperación de los microorganismos, se procede a realizar el ensayo de aptitud del método, donde se especifican la cantidad de muestra, los diluyentes, los medios de cultivo, los neutralizantes si correspondieran, las diluciones de trabajo, los materiales y la metodología a utilizar.

Se procede entonces a realizar el análisis, inoculando las preparaciones de producto con los microorganismos a evaluar (ver más arriba: Microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo microbiológico) y comparando contra un control, sin la presencia del producto a evaluar, inoculado en las mismas condiciones.

Se ejemplifica en las Figuras 2 y 3 los esquemas básicos para validación de la técnica de recuento y de detección de microorganismos específicos de productos no obligatoriamente estériles, donde.

Tubo A: resuspensión del cultivo microbiano a una determinada densidad óptica.

Tubo B: dilución seriada del tubo A con una concentración de microorganismos tal que, al ser inoculada en la preparación del diluyente con producto o diluyente sólo, permita una concentración final en la placa de recuento de no más de 100 UFC.

Tubo C: dilución seriada del tubo A con una concentración de microorganismos tal que al ser inoculada en la preparación del medio de cultivo con producto o medio de cultivo sólo permita una concentración final de inóculo de no más de 100 UFC.

C (-) Dil.: control negativo del diluyente o medio de cultivo

*C (-) Prod.: control negativo del producto en el diluyente o en el medio de cultivo**

Dil + Prod + Cepa: es la dilución del producto inoculada con la cepa en estudio

Dil + Cepa: es el control del diluyente sin producto inoculado con la cepa en estudio

* Este control es necesario para evaluar la posible carga microbiana que podría contener el producto bajo análisis que podría interferir con la recuperación del microorganismo desafiado.

En las Figuras 2 y 3 se representan con círculos las placas de Petri donde se realizarán los recuentos o identificaciones de las cepas en estudio. Para recuentos las farmacopeas indican al menos duplicados, aunque es recomendable efectuarlos por triplicado para aumentar la precisión

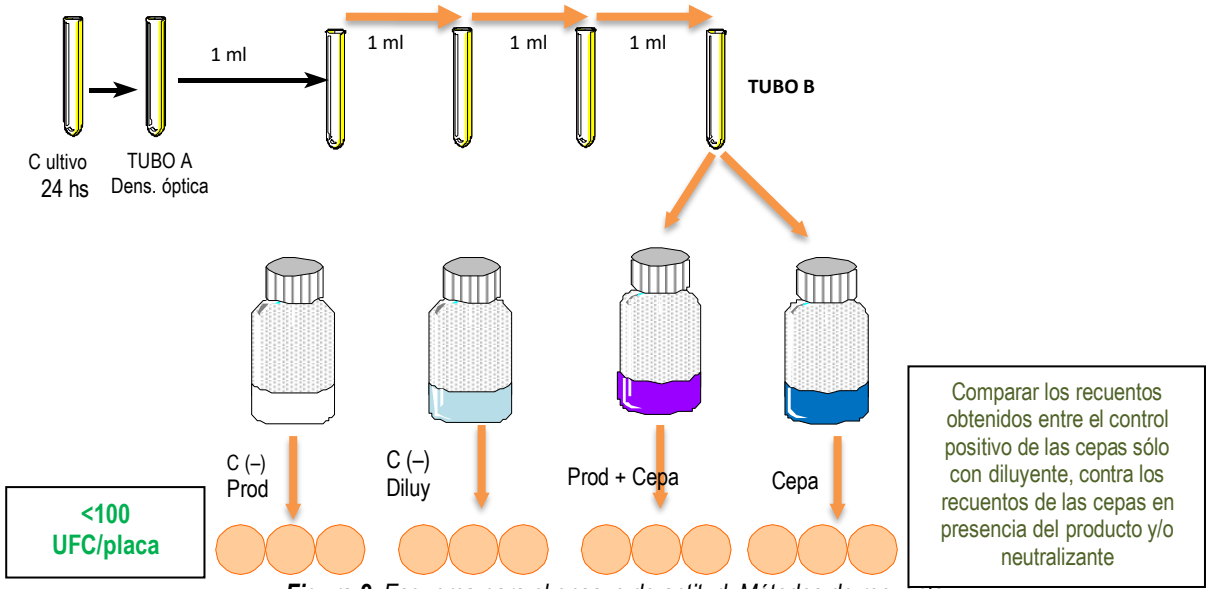


Figura 2. *Esquema para el ensayo de aptitud: Métodos de recuento*

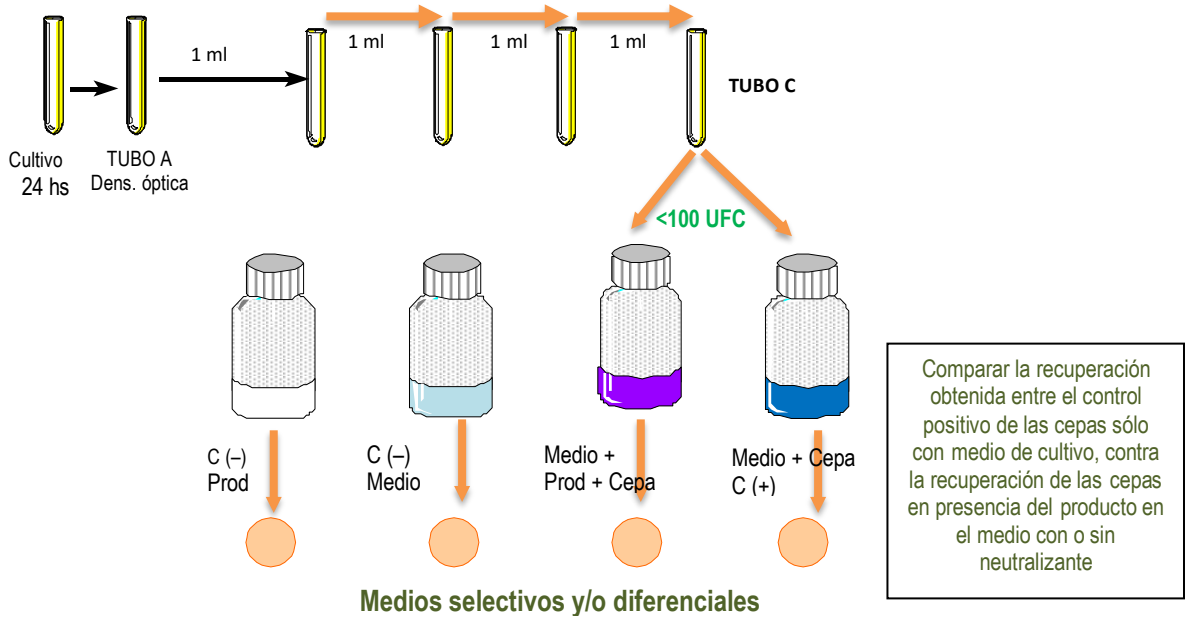


Figura 3. *Esquema para el ensayo de aptitud: Microorganismos específicos*

En los ensayos de aptitud de las técnicas para microorganismos específicos se podría considerar diferentes tiempos de incubación (mayores a 18 horas), o rangos (Ej.: 24 horas a 7 días) en la incubación de los medios de cultivo, para ser tenidos en cuenta durante fines de semana, feriados o problemas que pudieran surgir en el laboratorio que no permitan realizar los pasajes a medios diferenciales y/o selectivos en los tiempos establecidos en las farmacopeas, ya que si un microorganismo es detectado a las 18-24 horas de incubación, podría no ser detectado a tiempos mayores. En la Tabla VII se muestra un ejemplo ocurrido en nuestro laboratorio con un producto utilizando como cepa de análisis *Salmonella enterica* ATCC 14028 y TSB como medio de cultivo.

***Tabla VII**: Ejemplo de viabilidad de Salmonella entérica con producto a diluciones 1:100 y 1:500 entre 24 hs y 7 días, luego de efectuar el pasaje a caldo RVS y a agar XLD.*

Tiempo	Desarrollo en Agar XLD	
	Dilución 1:100	Dilución 1:500
24 hs.	+	+
48 hs.	+	+
3 días	+	+
4 días	+	+
5 días	-	+
6 días	-	+
7 días	-	+

Conjuntamente con este ensayo, se debe demostrar la recuperación microbiana en la incubación del medio TSB a 30-35 ºC en el menor volumen de ensayo utilizado en el laboratorio, desde las 18 hs y hasta los 7 días, iniciando el ensayo a To con altos inóculos: "carga máxima" (>10^3 UFC), para confirmar que el medio de cultivo y sus nutrientes no son limitantes bajo estas condiciones de ensayo y durante este rango de incubación, en el caso en que el producto estuviera altamente contaminado. Se presenta en la Tabla VIII, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio de la recuperación de microorganismos específicos con inóculos a To de <100 UFC (control positivo) y con inóculos a To de >10^3 UFC durante diferentes tiempos de incubación.

***Tabla VIII**: Recuperación microbiana en períodos de incubación mayores a 18 hs a partir de inóculos con alta carga microbiana.*

Microorganismo	18 hs.		48 hs.		3 días		4 días		5 días		6 días		7 días	
	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC	<100 UFC	>10^3 UFC
E. coli	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salmonella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S.aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5. Cumplimiento del ensayo de aptitud de un método microbiológico

Para que un ensayo de aptitud se considere completo, al menos 3 réplicas independientes (considerando días diferentes, suspensiones microbianas independientes, en lo posible diferentes operadores, etc.) del método deben ser llevadas a cabo y en cada una se debe demostrar que la recuperación microbiana en presencia del producto es similar al control sin producto (ensayo de recuperación de microorganismos específicos y ensayo de esterilidad) o que el promedio de las UFC recuperadas del inóculo del producto sea superior al 50% [4,9] o mayor al 70% [7]

comparadas con las obtenidas en el inóculo del control sin producto (ensayo de recuento de productos no obligatoriamente estériles).

> *Nota: considerando todos los métodos de neutralización ya expuestos en este capítulo el criterio de considerar cumplido un ensayo de aptitud con recuentos que superen el 70% con respecto al control es fácilmente alcanzable y dada la variabilidad propia en Microbiología nos permite un mayor grado de confianza en la recuperación microbiana que utilizando el criterio del 50% donde se asumiría que el producto sigue ejerciendo una inhibición considerable sobre el desarrollo microbiano.*

En el caso en que más de 3 réplicas fueran requeridas en el estudio de aptitud del ensayo, por obtenerse porcentajes de recuperación cercanos a los criterios de aceptación especificados, las comparaciones entre ensayos deben ser evaluadas estadísticamente transformando los datos obtenidos de UFC a sus logaritmos y analizando esos valores por el *test* de *Student* o ANOVA (análisis de la variancia) [7].

Puede ocurrir que, al proceder a realizar los ensayos de aptitud de una técnica, aplicando métodos de neutralización y procedimientos adecuados, no sea posible obtener la recuperación microbiana exigible para cumplir con los criterios de aceptación. Esto puede deberse a que el producto tenga propiedades antimicrobianas inherentes no neutralizables. Esta propiedad muchas veces no se manifiesta con todos los microorganismos utilizados en los ensayos de aptitud, por lo que, aunque no se alcancen los criterios de cumplimiento del ensayo de aptitud en su totalidad, se debe seguir efectuando el análisis microbiológico del producto, utilizando aquella técnica donde se obtuvo la mayor recuperación microbiana.

6. Protocolo de aptitud de un método microbiológico

El protocolo debe incluir al menos los siguientes ítems:

- Objetivo del ensayo.
- Técnica a ensayar.
- Condiciones del ensayo.
- Consideraciones generales determinadas en los ensayos preliminares. (pH en solución, solubilidad, perfil inhibitorio, neutralizantes ensayados, dilución de trabajo, etc.) (ver más adelante en este capítulo).
- Microorganismos ensayados/ Nº de pasaje de la cepa utilizada.
- Lotes de producto.
- Lotes de Medios y/o diluyentes.
- Criterios de aceptación.
- Resultados.
- Toxicidad.
- Efectividad.
- Observaciones.
- Conclusiones.
- Fecha - Analista – Verificación del responsable.

Ensayo preliminar

En los casos en que no se pueda prever, ni tampoco se encuentre en bibliografía, el comportamiento de los microorganismos frente a un producto al cual le debemos realizar el ensayo de aptitud, el siguiente ensayo preliminar, permitirá conocer y determinar el comportamiento de los microorganismos frente al producto y establecer los lineamientos generales de la técnica a aplicar.

Primero debemos considerar lo siguiente:

- ¿Tiene el producto el agregado de un agente antimicrobiano?
- ¿Conozco si el producto o su formulación (principio activo y/o excipientes) poseen propiedades antimicrobianas?

- ¿Conozco con anticipación cómo se comportarán los microorganismos frente a mi producto? (En general responder esta pregunta es muy difícil, pero en el caso que previamente hayamos ensayado productos con el mismo principio activo o parecida formulación, nos permitirá definir rápidamente la técnica a aplicar)
- ¿Qué propiedades químicas y físicas tiene el producto a ensayar? Es importante poder evaluar:
  - Estructura
  - Solubilidad
  - pH en solución
  - Capacidad quelante

Conociendo estos datos se puede determinar qué tipo de neutralizante o método sería aplicable ante una inhibición del crecimiento microbiano. Ver Tabla I.

El ensayo preliminar consiste en hacer diluciones seriadas del producto o la materia prima a ensayar en un medio de cultivo y desafiarlas con los microorganismos a evaluar. Ver Tabla IX.

Tabla XI: *Diluciones seriadas de la muestra*

1:10	1:100	1:1000	1:10000
1 ml ó g de producto en 9 ml TSB	1 ml de dil 1:10 en 9 ml TSB	1 ml de dil 1:100 en 9 ml TSB	1 ml de dil 1:1000 en 9 ml TSB

Una vez realizadas las diluciones seriadas de la muestra en el medio de cultivo, desafiar cada dilución de la muestra con un inóculo de <100 UFC/ tubo, no debiendo este inóculo superar el 1% del volumen final, o con 0,1 ml de una dilución de al menos 10^{-3} en buffer pH 7,2 de cultivos microbianos frescos de 24 horas crecidos en medio líquido de cada microorganismo. El criterio de utilizar <100 UFC/ tubo es el más estricto, pero a los fines de este ensayo preliminar ambas modalidades nos permiten evaluar las propiedades antimicrobianas del producto en análisis. En la **Tabla X** se muestra un esquema posible del ensayo preliminar, los microorganismos a ensayar dependerán del tipo de análisis y las especificaciones del producto a evaluar.

Tabla X: *Inoculación en tubos de dilución seriada de la muestra.*

Microorganismos inoculados (0,1 ml)	Dilución seriada de la muestra (10 ml)			
	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Staphylococcus aureus Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml
Pseudomonas aeruginosa Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml
Escherichia coli Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml
Salmonella enterica Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml
Bacillus subtilis Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml
Candida albicans Medio TSB	1 ml ó g 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml	1 ml 9 ml

Es importante:

- Hacer un control positivo de cada microorganismo sin presencia de producto
- Hacer control del producto en cada dilución sin inóculo para evaluar la posible carga microbiana del mismo (control negativo)
- Se pueden agregar otros microorganismos de interés (aislamientos ambientales, microorganismos aislados de envases primarios, etc.)
- Una vez fijada la dilución donde no hay inhibición se pueden estudiar diluciones intermedias entre ésta y la menor dilución donde se encontró inhibición. Tabla XIV.
- Si se observa inhibición incompatible con la sensibilidad del método, se pueden incorporar neutralizantes en el medio de cultivo y estudiar su eficacia repitiendo el mismo esquema del ensayo preliminar realizado sin neutralizantes.

ANÁLISIS Y MANEJO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO PRELIMINAR

Una vez inoculados los microorganismos, se deben incubar los tubos 18-24 horas a 30-35 ºC. Luego se verifica en cada dilución el crecimiento microbiano mediante turbidez (si el producto se disuelve totalmente en el medio de cultivo) y/o pasaje a medios sólidos (selectivos o no, dependiendo del microorganismo en estudio).

Se debe comprobar siempre antes de evaluar los resultados, el crecimiento microbiano en el tubo del control positivo y evaluar la posible carga microbiana del producto en análisis en los tubos de producto sin inóculo.

Los resultados se vuelcan en tablas que permitirán evaluar el comportamiento de los diferentes microorganismos frente al producto.

En las Tablas. XI, XII, XIII, XIV y XV se muestran los posibles resultados que se pueden obtener al realizar un ensayo preliminar.

Tabla XI. *El producto no presenta inhibición del crecimiento microbiano*

Microorganismo	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Staphylococcus aureus	+	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+
Escherichia coli	+	+	+	+
Salmonella spp	+	+	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+	+
Candida albicans	+	+	+	+

Tabla XII. *El producto presenta una actividad inhibitoria sobre el crecimiento microbiano que es neutralizada por dilución.*

Microorganismo	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Staphylococcus aureus	-	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	-	+	+	+
Escherichia coli	-	+	+	+
Salmonella spp	-	+	+	+
Bacillus subtilis	-	+	+	+
Candida albicans	-	+	+	+

.

***Tabla XIII**. El producto presenta actividad inhibitoria en el desarrollo bacteriano de ciertas cepas, que es parcialmente neutralizada por dilución. En estos casos se deben realizar diluciones intermedias entre la última dilución donde se encuentra inhibición y la primera donde hay desarrollo bacteriano. Ver Tabla XIV.*

Microorganismo	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Staphylococcus aureus	+	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+
Escherichia coli	-	-	+	+
Salmonella spp	-	-	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+	+
Candida albicans	+	+	+	+

***Tabla XIV.** El producto descripto en la tabla XIII que presentaba inhibición de dos cepas bacterianas deja de ser inhibitorio en diluciones intermedias, no analizadas en el primer ensayo preliminar.*

Microorganismo	1:100	1:200	1:300	1:400	1:500	1:1000
E. coli	-	+	+	+	+	+
Salmonella spp	-	+	+	+	+	+

Estos resultados son frecuentemente hallados en los ensayos preliminares, donde se confirma la utilidad del factor de dilución en la neutralización de las propiedades inhibitorias de ciertos productos.

***Tabla XIV**. El producto en análisis presenta actividad inhibitoria en el desarrollo bacteriano, la cual no es neutralizada por dilución.*

Microorganismo	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Staphylococcus aureus	-	-	-	+
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	+
Escherichia coli	-	-	-	+
Salmonella spp	-	-	-	+
Bacillus subtilis	-	-	-	+
Candida albicans	-	-	-	+

En estos casos, se repite el ensayo preliminar incorporando neutralizantes al medio de cultivo, o se procede a evaluar la posibilidad de utilizar el método de filtración por membrana si el producto es filtrable.

Es importante considerar que si el material analizado es un principio activo, que es generalmente del que menos se conocen sus propiedades antimicrobianas, el comprimido que posee este principio activo en menor cantidad, poseerá propiedades inhibitorias similares o menores, ya que generalmente los excipientes más comúnmente usados, no las tienen. Por lo que la técnica desarrollada para el principio activo generalmente se puede aplicar en los ensayos de aptitud de las formulaciones de producto terminado que contengan ese mismo activo.

Aptitud de los ensayos de efectividad antimicrobiana

El ensayo de efectividad antimicrobiana consiste en desafiar el producto o la formulación a evaluar con un inóculo de diferentes microorganismos, hasta una concentración final de $1x10^5$ - $1x10^6$ UFC/ ml ó g de la formulación a evaluar. Este inóculo no debe superar el 1% del volumen del producto en estudio. Una vez inoculadas las muestras se almacenan a 20-25 ºC y se determina el comportamiento de los microorganismos (crecimiento, muerte, bacteriostasis o alteración de propiedades del producto) a distintos tiempos. Estos tiempos varían según las farmacopeas vigentes, ya que aún no han sido armonizados [3y35]. Ver capítulo *Conservadores en Productos Farmacéuticos y Cosméticos* en este Manual.

La aptitud de estos métodos usados para determinar la efectividad antimicrobiana de formulaciones debe también ser demostrada.

Los microorganismos a utilizar son:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Escherichia coli ATCC* 8739 [3]
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis ATCC* 16404

La preparación de los inóculos es similar a la descripta anteriormente [Ver 4. Procedimiento, b) Preparación de los inóculos] con la diferencia que aquí se utilizarán los tubos de mayor concentración microbiana para realizar la inoculación de las muestras, mientras que las diluciones se utilizarán para efectuar los recuentos de los inóculos y así calcular el número de microorganismos inoculados en el producto.

Generalmente las formulaciones a las que se las somete al ensayo de efectividad antimicrobiana poseen conservantes con propiedades inhibitorias del crecimiento microbiano, por lo que la técnica a utilizar para cuantificar la carga microbiana a los distintos tiempos de incubación debe haber cumplido previamente con los ensayos de aptitud del método de recuento para la formulación en estudio. En estos casos el ensayo preliminar con el agregado de neutralizantes específicos permitirá diseñar la técnica más apropiada para la recuperación de los microorganismos utilizados.

Conclusiones

Es importante remarcar que la demostración de la aptitud del método de ensayo es la única herramienta de la que disponemos para poder determinar que nuestra técnica analítica sirve para el propósito para la que fue diseñada y que nuestros resultados son confiables.

Además al realizar los ensayos de aptitud de los métodos microbiológicos estamos desafiando en realidad el funcionamiento global de todo el laboratorio de Microbiología, ya que al realizar los controles microbianos que utilizamos en los ensayos de aptitud sin presencia de producto, estamos en realidad controlando integralmente los procedimientos de lavado de materiales, de elaboración de medios de cultivo y diluyentes, de mantenimiento de las cepas, de calibración y funcionamiento de los instrumentos, el desempeño de los operadores y asegurando la calidad de todos los resultados obtenidos en la tarea diaria.

Bibiliografía

1. The Microbiological Update. For Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics. Vol. 21, Nº 3, June 2003.
2. The Microbiological Update. For Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics. Vol. 22, Nº 1, April 2004.
3. USP <51>. *Antimicrobial effectiveness testing*
4. USP <61>. *Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests*
5. USP <62> Microbiological *examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms*
6. USP <71> S*terility tests*
7. USP <1227>*Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles*
8. Ph. Eur. Chapter 2.6.1 *Sterility*
9. Ph. Eur. Chapter 2.6.12 *Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests*
10. Ph. Eur. Chapter 2.6.13 *Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms*
11. Norma ISO/IEC 17025:2005 Chapter 5.4 *Methods of assay and calibration and validation of methods*.
12. Norma IRAM 301:2005. Capítulo 5.4 *Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos*.
13. Microbiology Guidelines: Journal of AOAC International, vol. 82, Nº2, 1999
14. Capítulo 90. *Control Microbiológico de Productos no obligatoriamente estériles*. *Validez del Método de Recuento*. Farmacopea Argentina 8va. Edición.
15. ICH Topic Q2 (R!) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. June 1995 CPMP/ICH/381/95
16. New Microbiology Chapters of the European Pharmacopoeia: Proceedings of the International Symposium, Strasbourg, France, 21-22 September 2006© Council of Europe.
17. Guidance for Industry Q2B Validation *of Analytical Procedures: Methodology*
18. Disposición 2819/2004 (4) Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (ANMAT) Ministerio de Salud. República Argentina.
19. Disposición 7667 Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (ANMAT) Ministerio de Salud. República Argentina.
20. Guide 04/10 Accreditation for Microbiological Laboratories (2002) Chapter 4: *Validation of test methods*.
21. *Microbial Limit and Bioburden Tests*. *Validation Approaches and Global requirements*. Lucia Clontz. Interpharm Press, Inc. (1998) Chapter 4: Validation of the USP Microbial Limit Test. (Preparatory testing).
22. *Desinfection, Sterilization, and Preservation* (4th edition) Seymour S. Block. Lea & Febiger (1991) Chapter 3: Principles of antimicrobial activity.
23. *Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices*. Madhu Raju Saghee, Tim Sandle and Edward C. Tidswell. Print Process INDIA (2011) Chapter 17: Antimicrobial Effectiveness Testing. Scott Sutton.
24. Parenteral Drug Administration, Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 56, No.5 Sept/Oct 2002
25. Curso "*Selección, verificación y validación de métodos microbiológicos*". Dictado por Scott Sutton durante el II Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos. Clamme 2009
26. "*Utilización de un buffer de fosfato pH 7,2 modificado para control microbiológico*." Sergio R. Iglesias, Néstor O. Aversa, Enrique Piccinni y Mónica A. Lagomarsino. Gador S.A. Presentación realizada en el XI Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial. Buenos Aires, Argentina. (2007)
27. *Desinfection, Sterilization, and Preservation* (4th edition) Seymour S. Block. Lea & Febiger (1991) Chapter 5: Kinetics of the inactivation of microorganisms.
28. FDA, 21 CFR 211, Volume 4 (2008)

29. *Does International Harmonization of the USP Microbial Limits Tests Require Re-Validation of Finished Product Tests?*. Scott Sutton, Microbiology Topics. Journal of Validation Technology (2009)

30. *Validation of Microbial Recovery from Disinfectants*. Scott Sutton et al. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Vol. 56, Nº5 (2002)

31. *Adaptive Evolution That Requires Multiple Spontaneous Mutations*. Barry G. Hall. Genetics, vol 120, 887-897 (1988)

32. *Mutation in continuous cultures*. Kubitschek H. E. and Gustafson L. A. Journal of Bacteriology, vol 88 Nº 6, 1595-1597 (1964)

33. *Selection in Chemostats*. Dykhuizen D. E. and Hartl D. L. Microbiology Reviews, 150-168 (1983)

34. *The apparent clock-like evolution of Escherichia coli in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics*. Wick L. M., Weilenmann H. and Egli T. Microbiology vol 148, 2889-2902 (2002)

35. Ph. Eur. Chapter 5.1.3 *Efficacy of Antimicrobial Preservation*

Agradecimiento: A Carlos De Roia, por colaborar en la revisión de este capítulo.

Capítulo IV.5.

Valoraciones de antibióticos por métodos microbiológicos

Mirta Franco

Definición

Cuándo usar un método microbiológico para cuantificar un antibiótico

Propósito

Determinación de la potencia (actividad) de un antibiótico por métodos microbiológicos

Técnicas: Técnica en placas y Técnica en tubos

Curva Dosis - Respuesta

Elección del diseño experimental

Descarte y reemplazo de datos aberrantes

Test de validez

Cálculo de la potencia y su intervalo de confianza

Bibliografía

Definición

Las valoraciones microbiológicas son un caso particular de valoración biológica. Como tal, consisten en cuantificar la potencia o actividad de una sustancia activa determinada comparando las concentraciones de una muestra y de una preparación patrón o de referencia que producen el mismo efecto, obteniéndose así una potencia relativa cuantitativa.
En el caso de las valoraciones microbiológicas de los antibióticos (antimicrobianos de uso clínico), la determinación de su potencia (actividad) se basa en la comparación cuantitativa de la inhibición del crecimiento de un microorganismo de ensayo en un medio adecuado, producida por al menos dos preparaciones, una de las cuales es el patrón. El microorganismo de ensayo debe ser susceptible al antibiótico a valorar y el medio de cultivo permitir un crecimiento rápido y abundante en ausencia del antibiótico.

Cuándo usar un método microbiológico para cuantificar un antibiótico

Las valoraciones por métodos microbiológicos están indicadas cuando así lo especifican las Farmacopeas o cuando es el único método aplicable, debido a la naturaleza química del antibiótico o a que la misma es desconocida. Dado que el método microbiológico determina la potencia (actividad) a través de la medición de la inhibición del crecimiento y no de propiedades físicas o estructuras químicas, no resulta indispensable conocer su composición. Si nos remontamos al descubrimiento de la penicilina por Fleming en el 1928, veremos que la actividad de la penicilina fue descubierta antes que se conociera su estructura química.
Por otra parte, muchos antibióticos pueden cuantificarse por otros métodos, físicos o químicos, pero aún en estos casos el método microbiológico puede constituir una alternativa de elección por su elevada sensibilidad y especificidad y/o por las características del laboratorio analítico.
Las muestras que pueden ser analizadas por métodos microbiológicos incluyen sustancias activas puras y productos compuestos, ya sea medicamentos, muestras clínicas, extractos naturales, etc., constituidos por

mezclas de sustancias relacionadas químicamente pero que difieren cuali y cuantitativamente en sus efectos biológicos, o por mezclas de sustancias no relacionadas químicamente pero que tienen actividad biológica.

Propósito

Las valoraciones microbiológicas se pueden utilizar para distintos propósitos: investigación y desarrollo de nuevas sustancias activas, seguimiento de procesos fermentativos de producción de antibióticos, ensayos de biodisponibilidad en fluidos corporales y control de calidad de materias primas y productos finales. Las características de los ensayos microbiológicos dependerán de estos propósitos. Así, en estudios de biodisponibilidad es necesario emplear ensayos microbiológicos muy sensibles, ya que la concentración de la sustancia activa en los fluidos corporales es muy baja, mientras que, cuando hay que determinar el tiempo de cosecha en un proceso fermentativo el método deberá producir resultados rápidos, y no necesariamente ser muy sensible, ya que las concentraciones de antibióticos son relativamente altas. Los ensayos microbiológicos usados en el control de calidad de antibióticos deberán ser fundamentalmente precisos y, eventualmente, rápidos y/o sensibles.

Determinación de la potencia (actividad) de un antibiótico por métodos microbiológicos

En la puesta a punto y realización de un ensayo microbiológico podemos considerar varias etapas, que desarrollaremos en este capítulo y que podemos resumir en el Figura 1.

Figura 1: *Etapas para la determinación de la potencia antibiótica por métodos microbiológicos*

1. Consulta bibliográfica (Farmacopeas)
- Preparaciones de referencia y unidades
- Técnicas sugeridas
- Microorganismos de ensayo y preparación de inóculos
- Medios de cultivo
- Diluyentes
- Rangos de concentraciones de las sustancias activas
- Temperaturas de incubación

2. Realización de la curva Dosis – Respuesta
- Rango de concentraciones del ensayo
- Transformaciones de datos para linealizar la respuesta

3. Elección del diseño experimental
- Examinar la validez del modelo matemático para calcular la potencia
- Estimar el intervalo de confianza de la potencia calculada

4. Ensayo microbiológico propiamente dicho

5. Descarte y reemplazo de datos aberrantes

6. Análisis de la validez del ensayo

7. Cálculo de la potencia y de su intervalo de confianza

Consulta bibliográfica.
La consulta bibliográfica previa es muy útil para conocer las especificaciones aplicables a los ensayos microbiológicos de antibióticos codificados, las que sirven de guía orientativa para la puesta a punto del ensayo.

Dado que las diferentes Farmacopeas presentan información muy completa sobre características de los ensayos tales como preparaciones de referencia y unidades, microorganismos de ensayo y preparación de inóculos, diluyentes para la preparación de las soluciones del patrón y de las muestras, rangos de concentraciones sugeridos, medios de cultivo y temperaturas de incubación, nos remitiremos a esa información, que no será transcripta en este capítulo.

Preparaciones de referencia y unidades.
Dado que los ensayos microbiológicos de antibióticos se basan en la comparación de los efectos de una muestra y un patrón de referencia, la importancia de este último es fundamental. Idealmente, un patrón de referencia debe ser estable, homogéneo, disponible en cantidades suficientes para un largo período y ser cualitativamente idéntico a la sustancia a ensayar.
Es necesario que la potencia de un antibiótico esté referida a un patrón común, por ello la OMS promueve el establecimiento de patrones biológicos internacionales para cubrir los requerimientos mundiales, los cuales surgen generalmente de estudios colaborativos entre varios países, y a los que se les asigna una potencia, preferentemente en unidades internacionales por miligramo, siendo definida la unidad de actividad biológica como la actividad específica contenida en un cierto peso. En muchos casos la unidad internacional es idéntica al microgramo equivalente.
Puesto que la cantidad disponible para su distribución es limitada, cada país debería establecer sus propios patrones nacionales, calibrándolos frente a los patrones internacionales. Para ensayos de rutina cada laboratorio necesita disponer de patrones de trabajo, cuya potencia debe ser determinada frente a patrones oficiales.
Cuando una sustancia puede ser caracterizada física y químicamente, no hay necesidad de un patrón biológico. Para estos casos la valoración microbiológica usa como patrón de referencia una sustancia de identidad y pureza conocidas, determinadas por medios físicos o químicos. Por ejemplo, para las penicilinas semisintéticas no son necesarios patrones biológicos. Una ventaja adicional de los patrones químicos es que están disponibles en grandes cantidades.

Preparación de las soluciones de patrones y muestras.
Como ya se mencionó, las formas químicas de las sustancias activas utilizables como patrones, así como la composición de los diluyentes para la preparación de soluciones concentradas y de trabajo, se especifican en las diferentes Farmacopeas. En general, los diluyentes son acuosos, lo que constituye una de las limitaciones de los ensayos microbiológicos, ya que sólo pueden aplicarse a sustancias activas solubles en agua.
Debido a la importancia que reviste la exacta concentración de las soluciones utilizadas como referencia, la preparación de las soluciones del patrón exige considerar cuidadosamente las pesadas y mediciones volumétricas. El peso no debe ser demasiado pequeño ni demasiado grande. Una cantidad demasiado pequeña puede ser causa de un error significativo o, si el material no es homogéneo, de un error de muestreo. Una cantidad grande requerirá excesivas diluciones, con el consiguiente error adicional. Frecuentemente se requiere que la potencia de un antibiótico se exprese en términos de peso seco; en estos casos el secado del material en un horno es una fuente adicional de error.
Si la muestra en ensayo es la sustancia activa misma, el método de preparación de la muestra es generalmente idéntico al del patrón. Si la muestra es un producto farmacéutico compuesto, un material de origen clínico o un producto natural crudo o parcialmente purificado, puede ser necesario separar cuantitativamente la sustancia activa de otras sustancias que puedan interferir en el ensayo, ya sean activas o inertes. Estas últimas pueden modificar la respuesta por producir adsorción (fase sólida) o partición (fases líquidas) de la sustancia activa. La presencia de sales o de nutrientes en la muestra puede modificar la velocidad de difusión de los antibióticos en medios sólidos o la velocidad de crecimiento de los microorganismos, respectivamente. Además, muestras proteicas como sangre o leche, pueden unir sustancias activas.

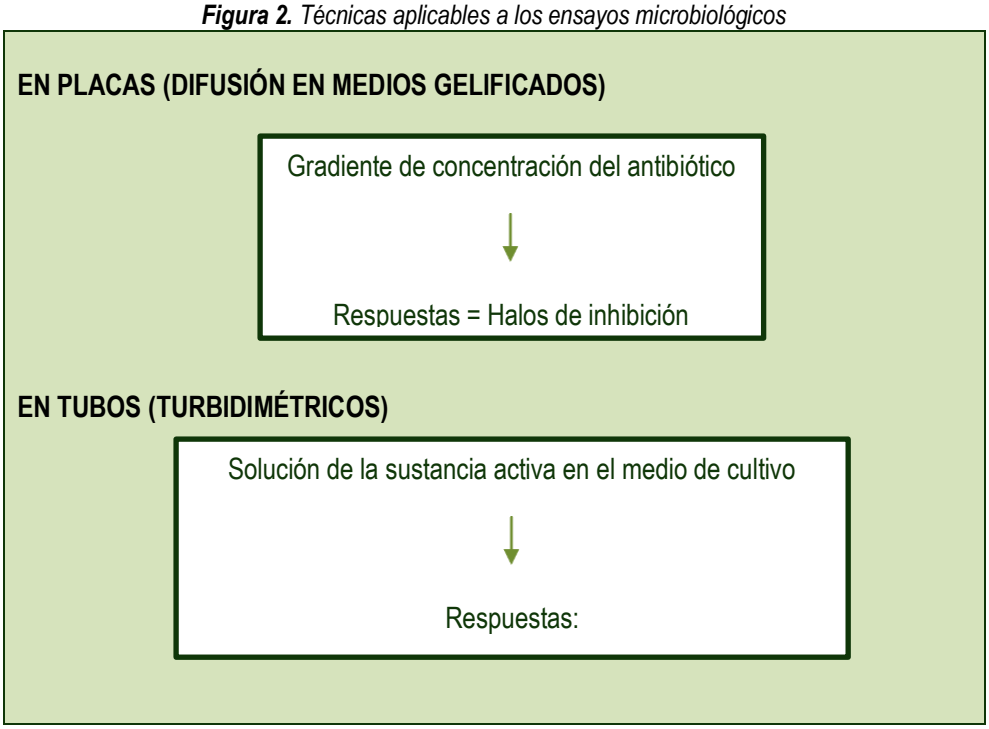
Microorganismos de ensayo y preparación de inóculos
Los microorganismos de ensayo codificados en las Farmacopeas pueden ser bacterias u hongos, idealmente no patógenos. Su conservación debe realizarse de acuerdo a normas internacionales que aseguren su pureza, incluso genética. La manipulación de los microorganismos por parte de personal entrenado en microbiología debe hacerse respetando los criterios de asepsia y bioseguridad ya conocidos.
La estandarización de las suspensiones inóculo generalmente se realiza por mediciones de absorbancia, en el caso de células vegetativas, y por recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) cuando se trata de suspensiones de esporos. En un ensayo microbiológico lo que interesa es el número inicial de

microorganismos viables, es decir con capacidad para reproducirse en las condiciones del ensayo. Si bien la estandarización de los inóculos por determinación de su absorbancia no es una medida de los microorganismos viables presentes, la preparación de ese inóculo en condiciones estandarizadas garantiza que la fracción de viabilidad en el inóculo sea aproximadamente constante y útil a los fines del ensayo. Aquí lo importante es que el número inicial de microorganismos viables sea el mismo en los sucesivos ensayos, más que conocer su valor numérico.

TÉCNICAS

Existen dos tipos de técnicas que se usan comúnmente para los ensayos microbiológicos de antibióticos: la técnica en placas o de difusión en medios gelificados y la técnica en tubos o turbidimétrica (Figura 2). En ambos casos los principios son los mismos: i) la comparación del efecto de una muestra (actividad desconocida) con el de un patrón de referencia (actividad conocida), ii) la medición del efecto inhibidor sobre el crecimiento del microorganismo de ensayo, iii) la existencia de alguna forma de relación cuantitativa entre las concentraciones de la sustancia activa y las respuestas y iv) que la relación cuantitativa sea la misma para el patrón y la muestra (condición de similitud).

Figura 2. *Técnicas aplicables a los ensayos microbiológicos*



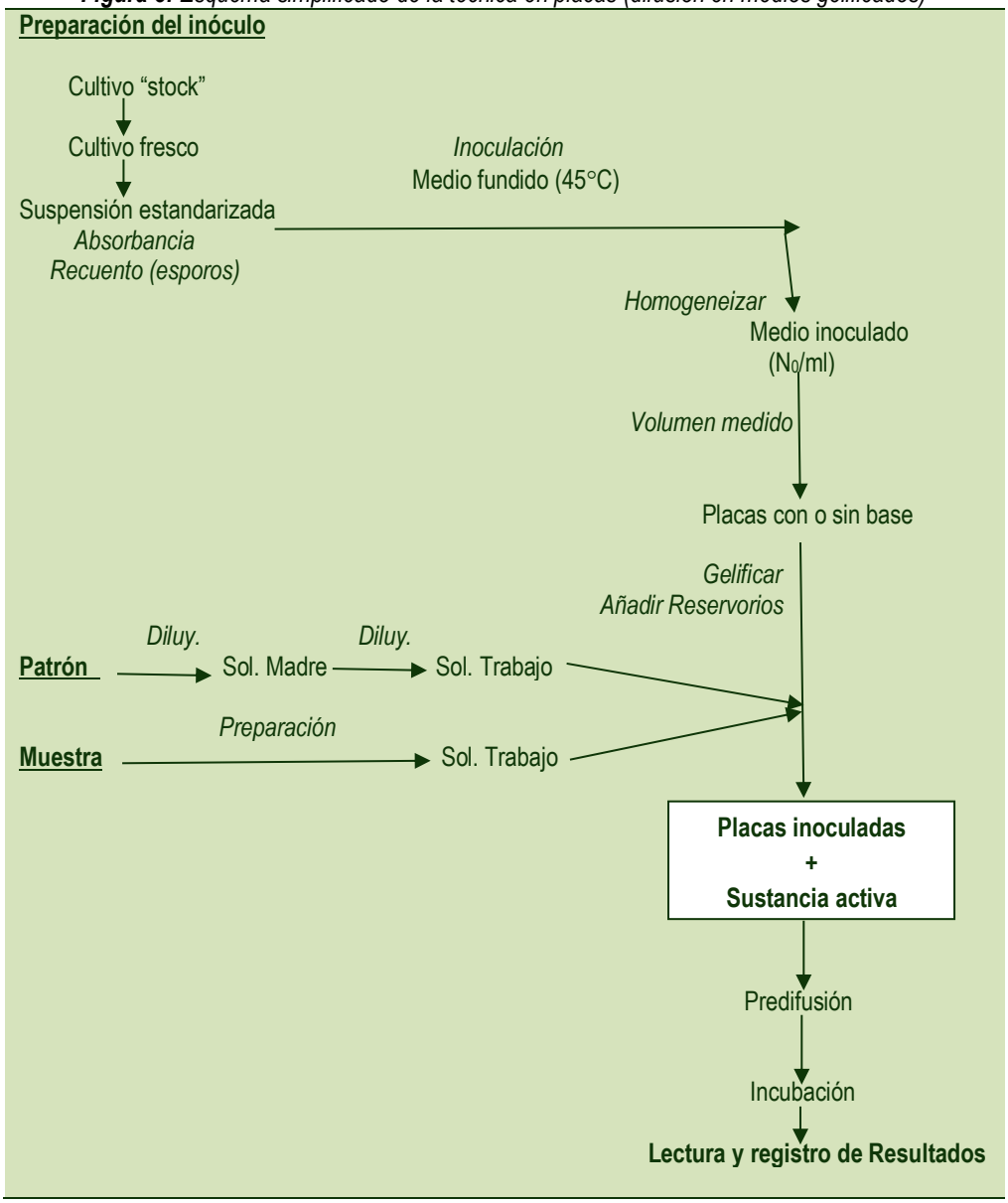
A continuación se describen los fundamentos y generalidades de cada técnica, dejando nuevamente claramente establecido que las especificaciones para los ensayos de cada antibiótico particular se encuentran codificadas en las Farmacopeas.

Técnica en placas

Brevemente diremos que un volumen medido de una suspensión estandarizada del microorganismo de ensayo se inocula en el medio de cultivo adecuado, previamente fundido y enfriado a una temperatura compatible con la viabilidad microbiana (42-45 ºC). Luego de homogeneizar el medio inoculado, por agitación, se vuelcan volúmenes medidos en placas de Petri que pueden contener o no una base de medio sin inocular ya gelificado. Una vez gelificado el medio inoculado, se insertan los reservorios para las soluciones de patrón y muestra. Estos reservorios pueden ser de diferente tipo: cilindros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno, aisladores de porcelana, papeles de filtro, o simplemente perforaciones circulares realizadas en el medio con un sacabocados. Luego, se colocan las soluciones de trabajo del patrón y las soluciones de la muestra en los reservorios, a razón de una en cada reservorio. La cantidad de reservorios por placa, de soluciones del patrón y

de la muestra y la distribución de cada uno dependerán del diseño del ensayo microbiológico. Más adelante aclararemos este punto. Finalmente, las placas se llevan a incubar en las condiciones establecidas y, al finalizar el período de incubación se registra el tamaño de los halos de inhibición que se observan alrededor de cada reservorio. En la Figura 3 se muestra un esquema resumido de esta técnica.

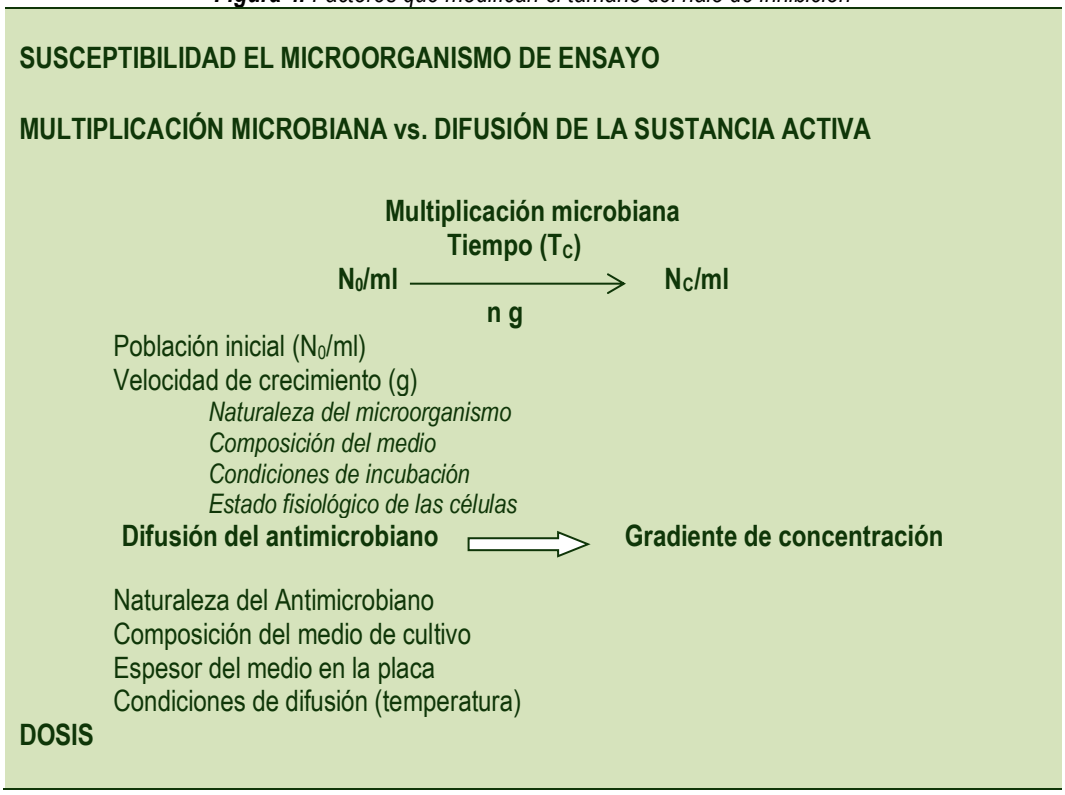
Figura 3: *Esquema simplificado de la técnica en placas (difusión en medios gelificados)*



Factores que modifican la magnitud de la respuesta:

Hemos dicho que un ensayo microbiológico de antibióticos en placas se basa en comparar los halos de inhibición que producen el patrón y la muestra. Ahora bien, para que la relación de tamaños de los halos de inhibición debidos al patrón y la muestra refleje sólo la relación de concentraciones de patrón y de muestra que producen el mismo efecto, es necesario controlar una serie de factores que modifican la magnitud de la respuesta y darían lugar a halos de diferentes tamaños para una misma concentración de antibiótico. En la Figura 4 se muestran los principales factores que inciden sobre la magnitud de la respuesta (tamaño del halo de inhibición) en un ensayo microbiológico de antibióticos en placas.

Figura 4. *Factores que modifican el tamaño del halo de inhibición*



Obviamente, el primer factor a considerar son las propiedades inherentes a la cepa microbiana, tanto en sus requerimientos culturales como en su susceptibilidad al antibiótico a ensayar. La utilización de microorganismos más susceptibles originará mayores halos de inhibición.

Durante la incubación ocurren simultáneamente dos fenómenos: i) la multiplicación de los microorganismos de ensayo y ii) la difusión del antibiótico en el cultivo.

Si denominamos N_0 a la población inicial de microorganismos inoculados y N_C a la población crítica, es decir, al número de microorganismos al tiempo de quedar definido el tamaño del halo de inhibición, el tiempo crítico (T_C) para alcanzar N_C a partir de N_0 será igual al tiempo de generación (g) multiplicado por el número de generaciones (n) durante ese tiempo. Dado que N_C es un valor constante para un determinado ensayo, el número de generaciones necesarias para alcanzarlo será menor cuanto mayor sea N_0. En consecuencia será menor T_C y, por lo tanto, el halo de inhibición será menor. Es decir, a mayor N_0 menor halo de inhibición y viceversa.

Un razonamiento similar permite comprender que cuanto mayor sea la velocidad de crecimiento (menor g), también será menor T_C y, consecuentemente, menor el halo de inhibición. Así todo parámetro que influya sobre la velocidad de crecimiento, como el tipo de microorganismo, el estado fisiológico de las células inoculadas, la composición cuali y cuantitativa del medio de cultivo y las condiciones de incubación, principalmente la temperatura, incidirán sobre el tamaño del halo de inhibición, de modo que a mayor velocidad de crecimiento menor halo de inhibición y viceversa.

Resumiendo, el tamaño de un halo de inhibición puede ser modificado variando el número inicial de microorganismos inoculados (N_0) y/o la velocidad de crecimiento (g) de los mismos en las condiciones del ensayo. Esto permite optimizar un ensayo microbiológico de un antibiótico que difunde poco y aumentar el tamaño de los halos de inhibición disminuyendo N_0 y/o la velocidad de crecimiento. La disminución de N_0 está limitada por la concentración necesaria para producir un crecimiento confluente (pátina) ya que concentraciones menores producirán colonias aisladas que impiden obtener halos de inhibición con bordes nítidos. Un artificio técnico que simula una disminución adicional de N_0 es agregar una etapa de predifusión antes de la incubación. Esta predifusión se lleva a cabo en condiciones que permiten la difusión del antibiótico en ausencia de multiplicación microbiana, usualmente se hace a bajas temperaturas. El efecto contrario a la predifusión lo produce una

preincubación, incubación en condiciones que permiten la multiplicación de los microorganismos sin difusión del antibiótico, es decir, previa a la incorporación de las soluciones del antibiótico. Así al momento de colocar los antibióticos en los reservorios el número de microorganismos será mayor que N_0.

La velocidad de difusión de los antibióticos en el cultivo es una característica propia de la molécula y el tamaño del halo de difusión dependerá de la naturaleza química del antibiótico y de la concentración de la solución presente en el reservorio. A tiempo 0, toda la sustancia está en los reservorios, pero a medida que transcurre la incubación, y eventualmente la predifusión, la sustancia difunde en el medio generando un gradiente de concentración que es máxima en el borde el reservorio y disminuye alcanzando un valor denominado *m´* en el borde del halo, relacionado matemáticamente con la concentración inhibitoria mínima del antibiótico en ensayo. Esta concentración *m´* estará más alejada del reservorio cuanto mayor sea la concentración de la sustancia activa dentro del mismo. No obstante, la velocidad de difusión depende además de varios factores, entre ellos la composición del medio de cultivo y su espesor dentro de la placa y de las condiciones de incubación en las que se lleva a cabo la difusión, principalmente la temperatura.

Solamente controlando todos estos factores, la respuesta, es decir, el tamaño del halo de inhibición será proporcional a la concentración de la sustancia activa en la solución contenida en el reservorio.

Veamos ahora qué pasos de la técnica en placas resultan críticos para su reproducibilidad, a la luz de los factores recientemente analizados:

- El número inicial de microorganismos está determinado por el volumen inoculado de la suspensión del microorganismo de ensayo. Al inocular un volumen medido de una suspensión estandarizada estamos garantizando la reproducibilidad del inóculo.
- Otra etapa crítica es la distribución del medio inoculado en las placas de Petri. Colocando un volumen medido del medio inoculado en cada una de las placas, que deben ser uniformes, y estar colocadas sobre una superficie perfectamente horizontal, estamos asegurando que el espesor del cultivo en cada una de las placas sea el mismo. Dado que la difusión de la sustancia activa desde el reservorio se realiza en forma radial, la difusión hacia los lados será menor cuanto mayor sea la profundidad del cultivo, y viceversa, siendo entonces el espesor otro de los factores que modifica la magnitud de la respuesta.
- También es necesario que durante la incubación todas las placas estén a la misma temperatura. Ya hemos dicho que la temperatura de incubación afecta tanto la velocidad de multiplicación de los microorganismos como la velocidad de difusión del antibiótico.

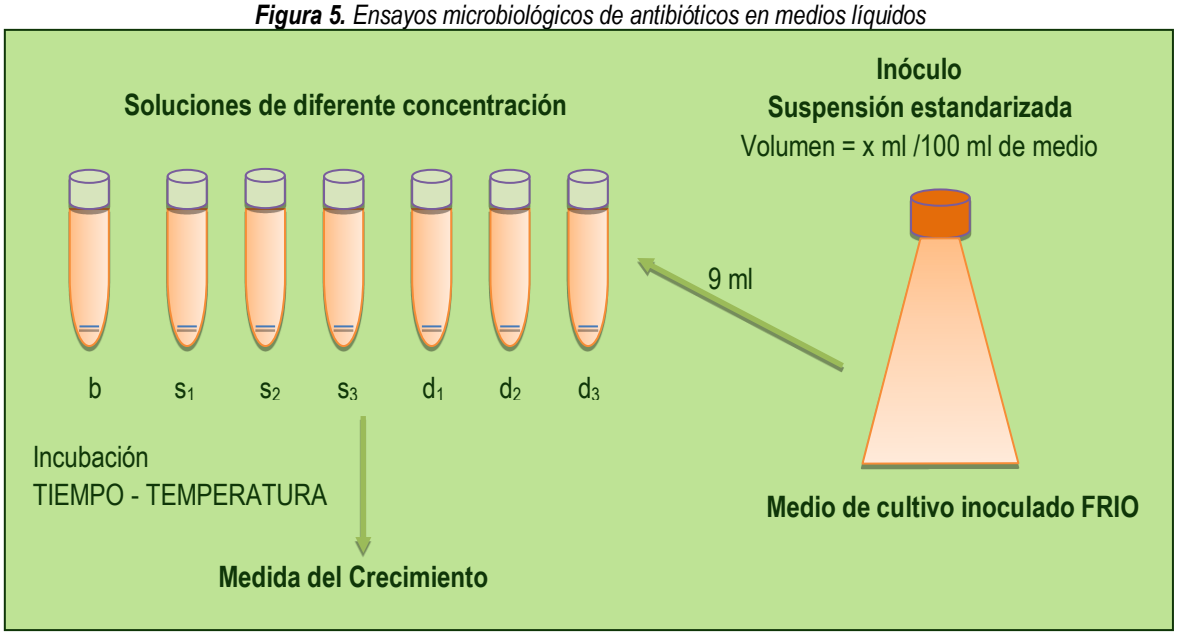
Más adelante veremos que los diseños en los que cada placa contiene todos los tratamientos permiten minimizar el error.

Técnica en tubos

En los ensayos microbiológicos de antibióticos en tubos se preparan soluciones de la sustancia activa (patrón y muestra) en un medio de cultivo que, en ausencia de dicha sustancia, permite el crecimiento rápido del microorganismo de ensayo. Para ello, una vez preparadas las soluciones de trabajo del patrón (s_1, s_2 y s_3) y de la muestra (d_1, d_2 y d_3), se coloca 1 ml de cada una de ellas si son acuosas y 0,1 ml si son soluciones alcohólicas, en series de tubos de ensayo, preferentemente estériles. Un tubo adicional que contiene el mismo volumen del diluyente corresponderá al blanco (b), y servirá como control de crecimiento y para calcular ciertas transformaciones de las respuestas. En general, se aconseja utilizar cuadruplicados de estas series. A cada uno de los tubos se les agrega 9 ml del medio de cultivo inoculado con un volumen medido de una suspensión estandarizada del microorganismo de ensayo, se mezclan por agitación y se llevan a incubar en las condiciones establecidas para cada antibiótico. El tiempo de incubación es de alrededor de 4 horas, razón por la cual la diferencia de tiempo entre el agregado del medio inoculado al primero y al último tubo puede producir errores significativos. Por ello, dicho agregado se debe hacer al azar, sin un orden preestablecido. Una estrategia que produce buenos resultados es mantener el medio a ser inoculado a temperaturas de refrigeración hasta el momento de ser inoculado. De esta manera la velocidad de crecimiento de los microorganismos de ensayo será nula o muy reducida hasta el momento de llevarlos a incubar, y prácticamente todos los tubos alcanzarán la

temperatura óptima de crecimiento al mismo tiempo. Se aconseja agregar un tubo adicional de s_1 y s_3 para ir observándolos durante la incubación y decidir el punto final; estos tubos no son considerados para el análisis de la respuesta. Cumplido el período de incubación, es necesario interrumpir el crecimiento microbiano, idealmente al mismo tiempo en todos los tubos o, de lo contrario, al azar. La interrupción del crecimiento se puede realizar sumergiendo los tubos a temperaturas de 80 ºC, cuyo principal inconveniente es que puede producir coagulación de proteínas y dificultar la lectura espectrofotométrica, o agregándoles a cada tubo un volumen fijo de una solución diluida de formol y mezclando inmediatamente. El tiempo de definición varía de acuerdo al sistema (antibiótico - microorganismo de ensayo) y a la densidad del inóculo. Finalmente, la respuesta cuantificable es una estimación del crecimiento del microorganismo de ensayo, generalmente absorbancia o transmitancia de los cultivos. Las lecturas se realizan contra un blanco de lectura que puede realizarse de diferentes maneras: i) usando medio de cultivo sin inocular, o ii) usando medio inoculado, ya sea manteniéndolo refrigerado durante el período de incubación o al que se le agrega la solución de formol a tiempo 0 y se lo incuba en paralelo con el ensayo. Esta última alternativa es recomendable porque presentará la turbidez debida al inóculo, si la hubiera, y los eventuales cambios de color del medio producidos durante la incubación.

Figura 5. *Ensayos microbiológicos de antibióticos en medios líquidos*



Factores que modifican la magnitud de la respuesta

A diferencia de lo que ocurre en los ensayos en placas, en los ensayos en tubos el único fenómeno a considerar durante la incubación es la multiplicación de los microorganismos de ensayo. En consecuencia las variables que inciden sobre la magnitud de la respuesta son, además de la dosis del antibiótico, el número inicial de microorganismos y la velocidad de crecimiento de los mismos, a los que se agrega el tiempo de incubación.

Tabla 1. *Influencia de la temperatura y el tiempo sobre la población final de E. coli.*

Tiempo de incubación	Temperatura de incubación		$N_{38\,°C} / N_{37\,°C}$
	37 ºC (g = 24,0 minutos)	38 ºC (g = 23,8 minutos)	
3 horas	178 N_0	221 N_0	1,24
4 horas	1005 N_0	1340 N_0	1,33

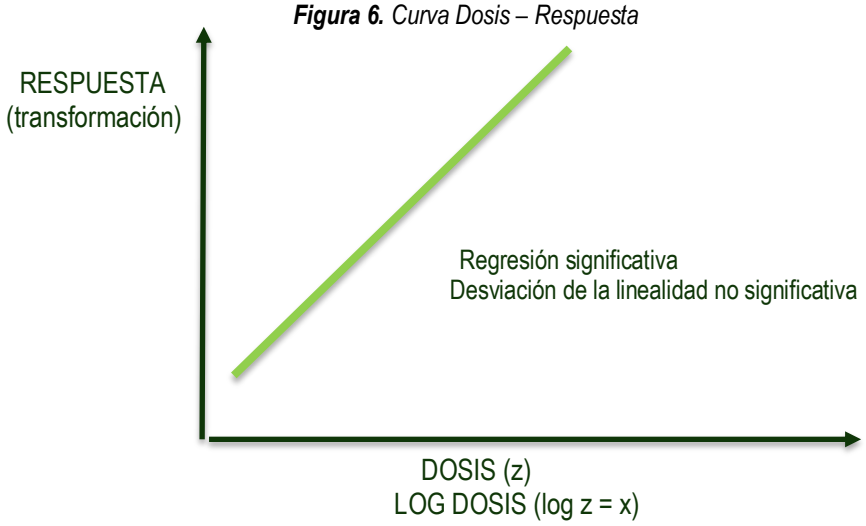
Una comparación del efecto de diferentes relaciones tiempo-temperatura sobre la magnitud del crecimiento de *Escherichia coli* se puede observar en la Tabla 1. Al cabo de 3 horas de incubación, un cultivo, cuyo tiempo de duplicación sea de 24 minutos (37 ºC), alcanzará un número de microorganismos de 178 veces el N_0, mientras que si el tiempo de duplicación es de 23,8 minutos (38 ºC), el número final de microorganismos será de 221 veces el N_0. Es decir, que un aumento de 1 ºC que produce una diferencia que parece insignificante en la velocidad de crecimiento, resulta en una población 24% mayor. Al cabo de las 4 horas esta diferencia aumenta, alcanzándose una población 33% mayor. A los fines de un ensayo microbiológico estas diferencias introducen un error considerable.

CURVA DOSIS – RESPUESTA

Previo al ensayo microbiológico de un antibiótico es necesario realizar una curva dosis – respuesta (D-R). La misma se realiza con una sola preparación: el patrón de referencia y en las mismas condiciones que se van a utilizar en el ensayo con la muestra. Usualmente se utiliza un mayor número de dosis de la sustancia activa, de modo de cubrir un rango más amplio de concentraciones que las que se van a usar en el ensayo propiamente dicho. El objetivo de esta curva es seleccionar un rango de concentraciones y la transformación de respuestas en los que la relación cuantitativa entre la dosis y la respuesta sea lineal (desviación de la linealidad no significativa) y muestre una regresión significativa, es decir que la variación de las dosis produzca variación de las respuestas.

En la figura 6 se muestra un gráfico de las respuestas (o sus transformaciones) en función de la dosis o del logaritmo de la dosis y se observa un rango de dosis en el que se cumplen los requisitos de regresión y linealidad. Es conveniente destacar que las transformaciones de las respuestas surgen de aplicar operaciones matemáticas a las mismas, por ejemplo: elevar al cuadrado, calcular la inversa, etc., y no modifican el análisis posterior de los resultados.

Figura 6. *Curva Dosis – Respuesta*



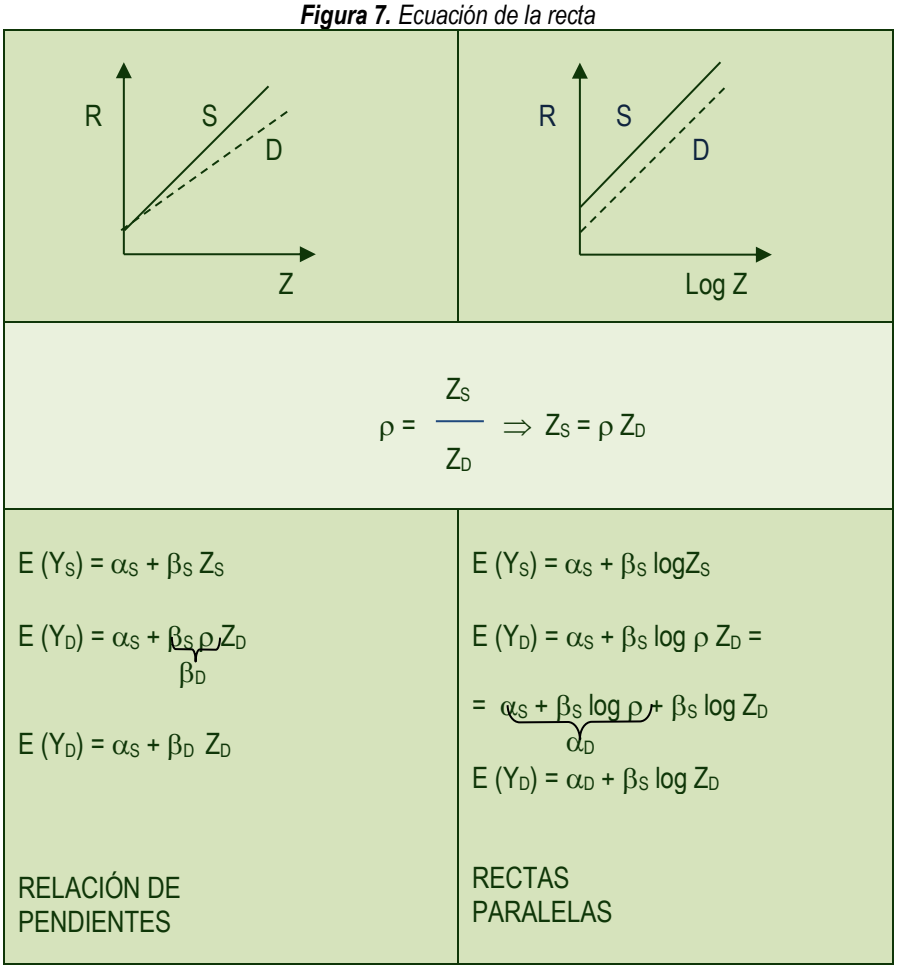
Al final del capítulo se presenta el análisis estadístico de una curva Dosis – Respuesta con un número par de dosis en progresión geométrica.

El análisis estadístico de los ensayos microbiológicos de antibióticos será diferente según que la relación lineal de las respuestas se verifique con respecto a las dosis o al logaritmo de las dosis. En el primero de los casos los ensayos microbiológicos se realizarán y analizarán de acuerdo al modelo de relación de pendientes y en el segundo de acuerdo a rectas paralelas. Esto surge de las ecuaciones correspondientes a las respectivas rectas, como se muestra en la Figura 7.

Definida la potencia relativa "ρ" como la relación entre la dosis del patrón (z_S) y de la muestra o desconocido (z_D) que producen el mismo efecto, es posible reemplazar en las ecuaciones de las rectas el valor de z_S por ρz_D. Comparando las ecuaciones finales del desconocido con las ecuaciones de las rectas del patrón se verá que en el primer caso (relación lineal con la dosis) la ordenada al origen es la misma y las pendientes diferentes, mientras que en el segundo caso (relación lineal con el logaritmo de la dosis) las ordenadas al origen son diferentes y la

pendiente es la misma. El primero constituye en ensayo de relación de pendientes y el segundo de rectas paralelas.

Figura 7. *Ecuación de la recta*



ELECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

En un comienzo, los ensayos microbiológicos se realizaban según técnicas más o menos empíricas que arrojaban resultados poco confiables. A medida que se fueron conociendo los principios del ensayo y las fuentes de error, se desarrollaron diseños experimentales que permiten obtener resultados confiables.

El diseño experimental que se elija permitirá: i) verificar la validez del modelo matemático sobre el que se basa la ecuación de la potencia, para una probabilidad dada (p=0,05) y ii) calcular el error y estimar el intervalo de confianza de la potencia calculada, para una probabilidad dada.

La condición ideal sería que todas las unidades experimentales (reservorios o tubos) para cada dosis den la misma respuesta. En ese caso la dispersión es cero y el resultado del ensayo será el parámetro poblacional. Sin embargo, en la práctica se observa variación de respuestas para la misma dosis. La manera de controlar las variables es: i) hacer que influyan de la misma manera sobre TODAS las unidades experimentales, ii) contemplarlas o segregarlas en el diseño, por ejemplo en los diseños con separación en bloques, las variables que afectan a todas las unidades de un mismo bloque se eliminan en el análisis estadístico y iii) aleatorizar las variables.

Los diseños experimentales mayormente empleados en los ensayos microbiológicos de antibióticos son los diseños factoriales con separación en bloques (técnica en placas) o sin separación en bloques (técnica en tubos)

Los diseños factoriales tienen las siguientes características: relación de dosis constante y, en el caso de los diseños con separación en bloques, todos los tratamientos en cada placa. Si bien no son requisitos excluyentes,

con el fin de facilitar el análisis estadístico, en este capítulo consideraremos sólo los diseños factoriales que además poseen igual número de dosis del patrón y de la muestra e igual número de respuestas por tratamiento.

El diseño factorial más simple que permite analizar todos los criterios de validez del ensayo: regresión, desviación del paralelismo y curvatura es el diseño 2 x 3 (ó 3 + 3) para el que se usan 3 concentraciones del patrón y 3 concentraciones de la muestra. Otro diseño factorial que suela emplearse es el 2 x 2 (ó 2 + 2), con la salvedad que no permite demostrar que no existe curvatura. El diseño que se basa en la interpolación de la respuesta de la muestra en la curva patrón ha ido siendo reemplazado por los diseños factoriales.

DESCARTE Y REEMPLAZO DE DATOS ABERRANTES

Los datos a descartar pueden obedecer a:

1. Fallas reconocidas durante la realización del ensayo
2. Posibles fallas descubiertas después de tabular las respuestas

    2.1. Atribuibles a irregularidades durante el ensayo

    2.2. Causa desconocida. En este caso se debe realizar el análisis de datos aberrantes para saber si corresponde descartarlos.

Cuando existen 2 o más tratamientos el criterio a seguir para el análisis de datos aberrantes es el siguiente:

1) Ordenar las respuestas de cada tratamiento en orden creciente o decreciente de magnitud.

2) Calcular el Rango (K) de cada tratamiento, como la diferencia entre la respuesta mayor y la respuesta menor

3) Calcular el valor de R, que resulta de dividir el mayor valor de K por la sumatoria de todos los K.

4) Comparar el valor de R obtenido con el valor crítico de R de tablas en las que k es el número de tratamientos y f es el número de respuestas por tratamiento.

Si el valor de R obtenido es mayor que el de tabla, el tratamiento es sospechoso de tener un valor aberrante. El paso siguiente es identificar la respuesta a descartar en aquel tratamiento que posee el mayor K. Una vez identificada se procede a descartarla y reemplazarla por un nuevo dato, calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{k\,T_t' + n\,T_b' - T'}{(k-1)(n-1)}$$

En ella k es el número de tratamientos, n es el número de bloques o placas, T_t' el total incompleto del tratamiento, T_b' el total incompleto del bloque y T' el total incompleto. Se entiende por totales incompletos las sumatorias de respuestas excluido el dato descartado.

Una vez reemplazado el dato descartado se procede nuevamente al análisis de datos aberrantes. Si el valor de R sigue siendo mayor al de la tabla, se sospecha que hay otro dato aberrante que deberá ser identificado de la misma manera que el anterior. Si el valor de R es menor que el de la tabla se procede al análisis de los resultados que correspondiere según el diseño, considerando el valor reemplazado, que resultará en la pérdida de un grado de libertad.

La posibilidad de descartar y reemplazar datos es limitada y, según la USP, puede variar entre 1 respuesta cada 25 a 50 respuestas.

TESTS DE VALIDEZ

Tienen por objeto determinar si un ensayo microbiológico es válido, es decir si las respuestas obtenidas pueden utilizarse para calcular la potencia del antibiótico en ensayo y el intervalo de confianza de dicha potencia. En los

ensayos microbiológicos con 3 niveles de dosis para cada una de las preparaciones (patrón y muestras), las fuentes de variación a analizar son: preparaciones, regresión, desviación del paralelismo, curvaturas (combinada y opuesta) y bloques, cuando el diseño incluye bloques. Las fórmulas para calcular las sumas de cuadrados correspondientes a cada fuente de variación y la tabla del análisis de la varianza para los diseños factoriales 2 x 3 con y sin separación en bloques se presentan al final de este capítulo. En ambos casos los criterios de validez son los siguientes:

Regresión:	**SIGNIFICATIVA (p < 0,05)**
	MUY SIGNIFICATIVA (p < 0,01)
Desviación del paralelismo:	**NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)**
Curvatura combinada:	**NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)**
Curvatura opuesta:	**NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)**

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)

CÁLCULO DE LA POTENCIA Y SU INTERVALO DE CONFIANZA

Si un ensayo microbiológico cumple los criterios de validez enunciados en el punto anterior, se procede a calcular la potencia de la muestra, que no será un valor puntual, sino que incluirá su intervalo de confianza, para una probabilidad dada. El cálculo de la potencia puede hacerse analítica o gráficamente, para los diseños factoriales 2 x 3 con y sin separación en bloques, las fórmulas son las siguientes.

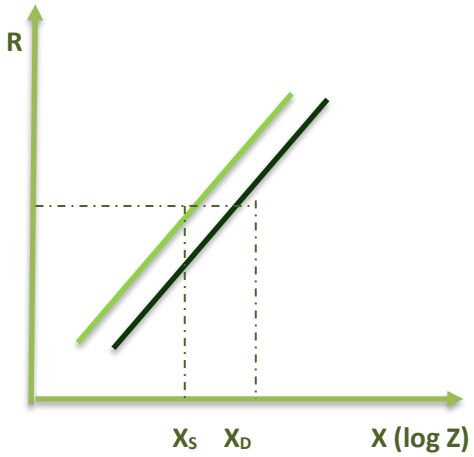
Cálculo de la potencia, Símbolos

$\underline{M}$ = logaritmo de la relación de potencias
$\overline{Y}_D$ = media de las respuestas del desconocido
$\overline{Y}_S$ = media de las respuestas del patrón
b = pendiente común
I = logaritmo de la relación de dos dosis sucesivas
R = relación de potencias

Cálculo:

Cálculo gráfico

$$M_D = x_S - x_D$$



Cálculo analítico

$$M_D = \frac{\bar{Y}_D - \bar{Y}_S}{b}$$

$$\bar{Y}_D = \frac{(D_1+D_2+D_3)}{3n}$$

$$\bar{Y}_S = \frac{(S_1+S_2+S_3)}{3n}$$

Donde:

S_1: Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.
S_2: Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.
S_3: Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.
D_1: Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido
D_2: Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido
D_3: Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido

$$b = \frac{L_S + L_D + L_{D'} + \cdots + L_{D''}}{2\ Inh}$$

$$I = \log s_2 - \log s_1$$

$$L_S = S_3 - S_1 \ ; \ L_D = D_3 - D_1$$

$$R_D = \text{antilog } M_D$$

POTENCIA CALCULADA de D = R_D x Potencia supuesta de D

La potencia supuesta se define como la potencia que tendría la muestra para que las soluciones de trabajo del patrón y de la muestra fueran idénticas:

$$Potencia\ supuesta = \frac{Peso\ patrón \times Potencia\ patrón \times Dilución\ desconocido}{Dilución\ patrón \times Peso\ (vol)\ desconocido}$$

La potencia calculada deberá coincidir con las especificaciones establecidas en la monografía correspondiente. Si no fuera así, el producto en análisis deberá ser rechazado.

Cálculo del intervalo de confianza de la potencia

$$\begin{matrix} M_S \\ \\ M_I \end{matrix} \diagdown\!\diagup \quad CM \pm \sqrt{(C-1)\,(CM^2 + c'/2)}$$

$$c' = \frac{4}{3}\ h$$ donde: c' es una constante que depende del esquema de dosis,
h = n° de preparaciones

$$C = \frac{E}{E - s^2\ t^2}$$ donde: E = SC regresión
s^2 = CM error
$t_{error;\ 0,975}$ = valor de tabla

$$R_S = \text{antilog } M_S$$
$$R_I = \text{antilog } M_I$$

$$P_S \text{ (límite superior)} = R_S \times \textit{Potencia supuesta}$$
$$P_I \text{ (límite inferior)} = R_I \times \textit{Potencia supuesta}$$

$$\%\, S = \frac{P_S - P}{P}\ x\ 100$$

$$\%\, I = \frac{P - P_1}{P}\ x\ 100$$

Hay una confianza del 95% de que la potencia del desconocido esté entre P_S y P_I. Si el intervalo de confianza excede los límites establecidos en la monografía correspondiente, significa que el ensayo no tiene la precisión adecuada. En ese caso, no corresponde informar la potencia calculada sino repetir el ensayo con mayor número de unidades (placas o tubos) para aumentar la precisión. Si se realiza más de un ensayo, y resultan homogéneos, es decir hay una importante superposición de los intervalos de confianza, la combinación de esos ensayos independientes generalmente resulta en un intervalo de confianza menor que el del ensayo más preciso.

Como conclusión, podemos decir que para informar la potencia de una muestra de un antibiótico, obtenida a partir de un ensayo microbiológico:

- El ensayo debe cumplir con los criterios de validez
- El intervalo de confianza de la potencia debe estar dentro de los límites establecidos en la monografía correspondiente.

APÉNDICE

TESTS DE VALIDEZ

Curva dosis respuesta

d = número de dosis
S_i = sumatoria de las respuestas a cada dosis
G = Sumatoria de todas las respuestas
n = número de respuestas a cada dosis o tratamiento = número de placas
N = número total de respuestas
R_i = sumatoria de las respuestas en cada placa
C = coeficiente lineal (varían según se trate de números de dosis pares o impares)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

1.- REGRESIÓN

$$SC\ regresión\ = \frac{(\sum_i C_i\ S_i)^2}{n\ \sum C_i^2}$$

2.- DESVIACIÓN DE LA LINEALIDAD

$$SC\ desviación\ de\ la\ linealidad\ = SC\ tratamientos\ - SC\ regresión$$

$$SC\ tratamientos\ = \frac{S_1^2\ +\ S_2^2\ +\ \ldots +\ S_d^2}{n}\ -\ \frac{G^2}{N}$$

3.- BLOQUES

$$SC\ bloques\ = \frac{R_1^2\ +\ R_2^2\ +\ \ldots +\ R_n^2}{d}\ -\ \frac{G^2}{N}$$

4.- TOTAL

$$SC\ total\ = \sum Y^2 - \frac{G^2}{N}$$

5.- ERROR

$$SC\ error\ = SC\ total\ -\ SC\ tratamientos\ - SC\ bloques$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM_{error})	p
Regresión	1				$< 0,01$
Desv. Linealidad	d – 2				$> 0,05$
Tratamientos	d - 1				
Bloques	n - 1				
Error	(d - 1) (n - 1)				
Total	N – 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA (F calculado > F de tabla)

Desviación de la linealidad: NO SIGNIFICATIVA (F calculado < F de tabla)

Ensayo microbiológico en placas (Difusión en medios gelificados)

Diseño factorial 3 + 3 con separación en bloques

Características del diseño

Log dosis equiespaciados (relación de dosis constante)

$$s_2/s_1 = s_3/s_2 = d_2/d_1 = d_3/d_2$$

Igual número de respuestas para cada tratamiento

Todos los tratamientos en cada placa

3 + 3 tratamientos

3 dosis del patrón (s_1, s_2, s_3)

3 dosis de cada desconocido (d_1, d_2, d_3, etc.)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

SÍMBOLOS:

S_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.
S_2	Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.
S_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.
D_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido
D_2	Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido
D_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido
S	$S_1 + S_2 + S_3$
D	$D_1 + D_2 + D_3$
G	Suma de todas las respuestas
n	Número de placas = Número de respuestas a cada tratamiento
N	Número total de respuestas
R_1	Suma de todas las respuestas de la placa 1
R_2	Suma de todas las respuestas de la placa 2
R_3	Suma de todas las respuestas de la placa 3
R_n	Suma de todas las respuestas de la placa n

1.- PREPARACIONES. No es exactamente un criterio de validez. Pretende investigar si la potencia supuesta estuvo bien supuesta.

$$SC\ preparaciones = [\,(S_1 + S_2 + S_3) - (D_1 + D_2 + D_3)\,]^2 / 6n$$

2.- REGRESIÓN. La suma de cuadrados de la regresión refleja la **regresión común**, por ello siempre es un contraste. Pretende reflejar si hay una relación dosis-respuesta real (si no se está trabajando en el ¨plateau¨ de la curva).

$$SC\ regresión = [\,(S_3 - S_1) + (D_3 - D_1)\,]^2 / 4n = E$$

3.- DESVIACIÓN DEL PARALELISMO. Es un criterio de validez fundamental que refleja la condición de similitud entre patrón y desconocido. Es un contraste cuando hay dos preparaciones. Sin embargo cuando hay más de dos preparaciones no es un contraste porque se comparan tantas regresiones como preparaciones hay.

$$SC\ desviación\ del\ paralelismo = [\,(S_3 - S_1) - (D_3 - D_1)\,]^2 / 4n$$

4.- CURVATURA COMBINADA. Es una curvatura común o promedio de patrón y desconocido. No debe haber curvatura, los tres puntos deben estar alineados. Es un contraste. Cuando hay dos preparaciones, un paréntesis refleja la curvatura del patrón y otro la del desconocido. Cuando los tres puntos de cada preparación están alineados, cada paréntesis es cero

$$SC\ curvatura\ combinada = [\,(S_1 - 2S_2 + S_3) + (D_1 - 2D_2 + D_3)\,]^2 / 12n$$

5.- CURVATURA OPUESTA. Refleja si las curvaturas del patrón y del desconocido son opuestas o en la misma dirección pero de distinto grado. Puede no haber curvatura combinada por compensarse las de diferente signo y sí haber curvatura opuesta. Se desea que ninguna de las dos sea significativa. Es un contraste cuando hay dos preparaciones. Si hay más de dos preparaciones no es un contraste y los grados de libertad son el número de preparaciones menos 1.

$$SC\ curvatura\ opuesta = (S_1 - 2S_2 + S_3) - (D_1 - 2D_2 + D_3)\,]^2 / 12n$$

6.- TRATAMIENTOS. Cada dosis de cada preparación es un tratamiento. No es un contraste, se comparan tantos términos como tratamientos hay (totales o medias). No es necesario como test de validez. Se usa como control de cuentas.

$$SC\ tratamientos = (S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + D_1^2 + D_2^2 + D_3^2)/n - G^2/N$$

7.- BLOQUES. No es un contraste. La SC entre bloques es independiente de la SC entre tratamientos. No incide sobre la potencia calculada. Permite eliminar la variabilidad debida a los bloques del error total, que tiene que ver con la precisión, es decir disminuye la amplitud del intervalo de confianza. Una variación excesiva puede indicar que la metodología no está puesta a punto.

$$SC\ bloques = (R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \ldots + R_n^2)/6 - G^2/N$$

8.- TOTAL. Refleja la variabilidad total entre todas las respuestas. Es el camino más simple para calcular la SC del error.

$$SC\ total = \sum Y^2 - G^2/N$$

9.- ERROR. Mide la variabilidad debida a causas no controladas en la experiencia.

$$SC\ error = SC\ total - SC\ tratamientos - SC\ bloques$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM_{error})	p
Preparaciones	1				
Regresión	1				$< 0,01$
Desv. Paralelismo	1				$> 0,05$
Alternativa 1:					
Curv. combinada	1				$> 0,05$
Curv. opuesta	1				$> 0,05$
Alternativa 2:					
Curvatura	2				$> 0,05$
Tratamientos	6 - 1				
Bloques	n - 1				
Error	N – n – 5				
Total	N – 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA ($p < 0,05$)
MUY SIGNIFICATIVA ($p < 0,01$)

Desviación del paralelismo: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura combinada: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura opuesta: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Medio líquido

Factorial 3 + 3 totalmente aleatorizado

Características del diseño

Igual número de dosis de cada preparación

3 dosis del patrón (s_1, s_2, s_3)
3 dosis de cada desconocido (d_1, d_2, d_3, etc.)

log dosis equiespaciados (relación de dosis constante)

$$s_2/s_1 = s_3/s_2 = d_2/d_1 = d_3/d_2$$

Igual número de respuestas para cada tratamiento

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

SÍMBOLOS

S_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.
S_2	Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.
S_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.
D_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido 1
D_2	Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido 1
D_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido 1
S	$S_1 + S_2 + S_3$
D	$D_1 + D_2 + D_3$
G	Suma de todas las respuestas
n	Número de respuestas a cada tratamiento
N	Número total de respuestas

TESTS DE VALIDEZ

1.- PREPARACIONES.

$$SC\ preparaciones = [(S_1 + S_2 + S_3) - (D_1 + D_2 + D_3)]^2 / 6n$$

2.- REGRESIÓN.

$$SC\ regresión = [(S_3 - S_1) + (D_3 - D_1)]^2 / 4n = E$$

3.- DESVIACIÓN DEL PARALELISMO.

$$SC\ desviación\ del\ paralelismo = [(S_3 - S_1) - (D_3 - D_1)]^2 / 4n$$

4.- CURVATURA COMBINADA

$$SC\ curvatura\ combinada = [(S_1 - 2S_2 + S_3) + (D_1 - 2D_2 + D_3)]^2 / 12n$$

5.- CURVATURA OPUESTA.

$$SC\ curvatura\ opuesta = [(S_1 - 2S_2 + S_3) - (D_1 - 2D_2 + D_3)]^2 / 12n$$

6.- TRATAMIENTOS.

$$SC\ tratamientos = (S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + D_1^2 + D_2^2 + D_3^2)/n - G^2/N$$

7.- TOTAL.

$$SC\ total = \sum Y^2 - G^2/N$$

8.- ERROR.

$$SC\ error = SC\ total - SC\ tratamientos$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM_{error})	p
Preparaciones	1				
Regresión	1				$< 0,01$
Desv. Paralelismo	1				$> 0,05$
Alternativa 1:					
Curv. combinada	1				$> 0,05$
Curv. opuesta	1				$> 0,05$
Alternativa 2:					
Curvatura	2				$> 0,05$
Tratamientos	6 - 1				
Error	N – 1 – 5				
Total	N – 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA ($p < 0,05$)
MUY SIGNIFICATIVA ($p < 0,01$)

Desviación del paralelismo: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura combinada: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura opuesta: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$).

Bibliografía recomendada

USP <81> *Antibiotics – Microbial assay*

Farmacopea Europea 2.7.2. *Microbiological assay of antibiotics*

Hewitt, W. "*Microbiological Assay - An Introduction to Quantitave Principles and Evaluation*" - Academic Pres, 1977

Hewitt, W. and Vincent, S.: "*Theory and application of microbiological assay".* Academic Press, 1989

Hewitt, W: "*Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: a Rational Approach".* Llandysul, UK, CRC Press; 2003:1-260.

Kavanagh, F. *Analytical Microbiology* (1963)

Kavanagh, F. *Analytical Microbiology*. Volumen II (1972)

Capítulo V.6

Valoración microbiológica de Vitaminas

Graciela Torno

Introducción

Equipos utilizados

Material utilizado

Preparación de medios, estándar, inóculo y muestras

Procedimiento del ensayo

Curva dosis-respuesta

Validación del método de valoración microbiológica

Introducción

Este método utiliza la propiedad que tienen ciertos microorganismos de multiplicarse en presencia de una determinada vitamina y no multiplicarse en su ausencia. El tiempo de incubación y la composición del medio de cultivo utilizado es tal que la cantidad de vitamina en los tubos es el único factor limitante. Bajo estas condiciones, el total de masa microbiana es proporcional a la cantidad de vitamina en el tubo.

Los ensayos microbiológicos cuantitativos son métodos relativos y no absolutos. La respuesta de un microorganismo en una muestra es comparada con la respuesta del mismo microorganismo en las mismas condiciones con un estándar de concentración conocida.

Se utilizan métodos microbiológicos en lugar de utilizar métodos químicos para la determinación de la potencia de algunas vitaminas cuando el contenido de la misma en la muestra es muy bajo. Además, los métodos químicos no tienen en cuenta la actividad biológica de los compuestos. Por ejemplo, las formas *d* y *l* de una sustancia pueden ser indistinguibles para el método químico a pesar de que sólo uno de estos enantiómeros puede ser activo. Esto es detectado sólo por el método microbiológico.

Equipos utilizados

- Autoclave
- Heladera
- Tanque criogénico (otro método para la mantención de cepas)
- Baño termostático con circulación de agua, con una diferencia de temperatura máxima entre puntos de ± 0.5°C
- Balanza de precisión (para pesadas del estándar y en algunos casos de las muestras)
- Baño de ultrasonido
- Dilutor
- Baño de agua a 100°C
- Micropipeta
- Vortex
- Espectrofotómetro

Todos los equipos GMP relevantes deben encontrarse calificados y calibrados antes de ser utilizados.

Material utilizado en general

Dentro del material general, se utilizan matraces, pipetas aforadas y graduadas, vasos de precipitados, frascos para contener el agua destilada para diluir, etc.

El material debe estar totalmente separado del material utilizado en las tareas habituales del laboratorio. Se debe tener presente que las cantidades de vitamina que se detectan mediante este método son tan bajas que cualquier contaminación con otro medio que contenga estas vitaminas invalidaría el ensayo.

El material, luego de ser utilizado, se enjuaga y es sumergido en una solución de detergente Extran alcalino 3% (preparada con agua purificada) por un tiempo aproximado de 10 horas. A continuación se enjuaga primero con agua potable y luego con agua purificada. Se seca y se guarda.

Preparación de medios, estándar, inóculo y muestra

- *Agua a utilizar:*

Se utiliza agua destilada, la cual puede almacenarse en envases de vidrio que hayan recibido el mismo tratamiento que el material en general.

- *Soluciones utilizadas en el momento de la preparación de la muestra*:

En la Tabla 1 se indican las soluciones comúnmente utilizadas, pero también pueden ser necesarios agregados de NaHO 0.01N, NH_3 2%, HCl 4N, KHO 1N, metanol y/o acetona o algún emulsificante como el Tween 80.

Tabla 1: *Soluciones, medios de cultivo y microorganismos*

	Biotina	Vitamina B_{12}	Ácido fólico
Soluciones utilizadas en el momento de la preparación de la muestra (extracción de la vitamina)	*Solución de tiosulfato de sodio*: $Na_2S_2O_3.5H_2O$: 5 g H_2O destilada: 1000ml	*Buffer pH 5.3* $Na_2PO_4H.2H_2O$ 20 g Ácido cítrico 10 g $Na_2S_2O_5$ 1 g H_2O destilada: 1000 ml	*Buffer pH 8.3* $K\ PO_4H_2$ 1.3 g K_2PO_4H 50 g H_2O destilada 1000 ml
Medios de cultivo	Biotin Assay Medium BD art. 24191 3.75 g/ 100 ml	B12 Assay Medium BD art. 245710 4.25 g/ 100 ml	Folic AOAC Medium BD art. 212169 5.5 g / 100 ml
Microorganismos utilizados	*Lactobacillus planctarum* (*arabinosus*) ATCC 8014	*Lactobacillus leichmanii* ATCC7830	*Streptococcus faecium* ATCC 8043

- *Microorganismos (Mantenimiento de cepas y preparación de inóculo)*

  A - Mantenimiento de cepas

  Hay diversas formas de mantenimiento de estas cepas. En cualquiera de ellas se utilizan los siguientes medios de cultivo: M.A.C.A. (Micro Assay Culture Agar), Lactobacilli Broth y Tomato juice agar.

  1- Una forma de mantenimiento de estas cepas es en refrigerador (2 °C a 8 °C) en agar MACA en forma de punción, realizando pasajes semanales. Recordar que no debe realizarse más de 5 pasajes desde la cepa de origen

  2- Otra forma es mantenerlas en nitrógeno líquido. De esta manera se prepara la cantidad de inóculo que se utilizará en dos años, se fracciona en crioviales y se guarda en el interior de un tanque criogénico (a aproximadamente -193 °C).

  Si se parte de un cultivo ATCC (liofilizado), el contenido se resuspende en aproximadamente 2 ml de

Lactobacilli Broth y de allí se realiza un repique por punción en M.A.C.A. Se incuba a 37°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se realiza un nuevo repique desde M.A.C.A a 300 ml de Lactobacilli Broth. Se incuba aproximadamente 6 horas para *Streptococus faecium* y 12 horas para *Lactobacillus leichmanii* y *Lactobacillus planctarum* a 37 °C. Al cabo de esta incubación se observa un crecimiento abundante en el medio de cultivo. Se realizan 3 lavados con medio de cultivo correspondiente a la valoración a realizar (ejemplo: si se está preparando para su mantenimiento *Lactobacillus arabinosus*, se lava el inóculo con Biotin Assay Medium). El medio se prepara según indicación del proveedor, y lleva el agregado de 15% de glicerina (como crioprotector). Luego del último lavado se deja el inóculo resuspendido en aproximadamente 200 ml del medio. Se fracciona, colocando 1.5 ml por criovial, y se coloca en el tanque criogénico.

Si se parte de un cultivo en criovial, el contenido de éste se incorpora directamente en los 300 ml de Lactobacilli Broth y se continúa como en la técnica explicada en el párrafo anterior.

3- Otras formas de mantenimiento son por liofilización y en freezer a -80 °C con agregado de criopreservante.

B- Preparación del inóculo

Para el primer caso de mantenimiento de cepas que se ha nombrado, es decir el cultivo mantenido en medio M.A.C.A en refrigerador, se realiza un repique en Lactobacilli Broth, se incuba el tiempo correspondiente (6 horas o 12 horas), se centrifuga a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante, y se realizan 2 lavados con solución fisiológica. Finalmente se toman 1.5 ml de esta suspensión, se agregan a 300 ml de solución fisiológica y con 0.5 ml de esta última se inocularán los tubos del ensayo.

En caso de partir del microorganismo mantenido en tanque criogénico, se toma el contenido de un criovial y se coloca en 300 ml de solución fisiológica, se agita y con 0.5 ml de esta suspensión se inocularán los tubos del ensayo.

- *Preparación del estándar*

Se prepara la solución estándar (solución madre) a partir de un estándar USP u otro estándar (por ejemplo secundario), exactamente pesados. La solución madre, puede ser guardada durante tres meses, a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y resguardada de la luz.

A continuación se expresan las concentraciones sugeridas de las soluciones madre de biotina, vitamina B12 y ácido fólico:

-*Solución madre estándar de biotina*: 0.12 mg de D(+) biotina/ ml solución

Ejemplo: pesar aproximadamente 24 mg de estándar de referencia de biotina, exactamente pesados en una cantidad de agua conteniendo 1 ml de solución NH_3 2%, agregar 100 ml de etanol y llevar a 200 ml con agua destilada

-*Solución madre estándar de vitamina B_{12}*: 2.45 µg de cianocobalamina/ ml

Ejemplo: Pesar aproximadamente 490 µg de estándar de referencia de cianocobalamina exactamente pesados (generalmente los estándar USP de referencia tienen una potencia tal que. para obtener esta cantidad de microgramos, la pesada a realizar es de una cantidad de mg) en 30 ml de agua. Agregar 100 ml de etanol y llevar a 200 ml con agua destilada

-*Solución estándar de ácido fólico*: 96 µg de ácido fólico/ ml

Ejemplo: Pesar aproximadamente 24 mg de estándar de referencia de ácido fólico anhidro, exactamente pesados. Disolver en 50 ml de NaOH 0.01N y llevar a volumen de 250 ml con buffer pH 8.3

- *Preparación de la muestra*

En algunos casos las muestras sólidas deben ser molidas y con ayuda de agua destilada, se forma una suspensión para poder ser trasvasadas al correspondiente matraz. En general se tratan las mismas con las soluciones nombradas en el punto "Soluciones, medios de cultivo y microorganismos". Realizar diluciones de tal manera que la concentración de la última solución debe ser similar a la concentración de la última solución de estándar.

Procedimiento del ensayo

Se elabora el protocolo del ensayo asociado a la vitamina a determinar y al producto a analizar, documentando las diluciones de estándar (St) y muestra a realizar.

Para la valoración de vitamina, se utiliza el diseño de rectas paralelas. Para ello se utilizan tres dosis por triplicado, las cuales deben mantener una relación constante entre ellas. Por ejemplo se podrían cargar los tubos de ensayo con 200 µl, 400 µl y 800 µl de la última solución de estándar y de muestra. A continuación se detalla la carga de blancos, estándar y una muestra para la valoración.

- Dos tubos de ensayo conteniendo sólo medio de cultivo (blanco)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis baja de estándar (St bajo)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis media de estándar (St medio)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis alta de estándar (St alto)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis baja de muestra (Muestra bajo)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis media de muestra (Muestra medio)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis alta de muestra (Muestra alto)
- Dos tubos de ensayo conteniendo sólo medio de cultivo (se utilizará como blanco inoculado)

Cada tubo (con excepción de los blancos) es cargado con estándar y muestra y llevado a volumen final de 10 ml con medio de cultivo. Luego se esteriliza por autoclave a 121 °C, entre 5 y 10 minutos dependiendo de la vitamina que se está valorando (ver Tabla 1).

Se enfría a temperatura ambiente e se inocula con 0.5 ml del inóculo preparado en la sesión *"Preparación del inóculo"*. Se inoculan los tubos que contienen estándar, muestra y los dos tubos con medio marcados como blancos inoculados.

Se incuba de 16 a 26 horas entre 30 °C y 40 °C. Es importante que una vez definida la temperatura, las diferencias entre los puntos dentro del baño termostático no superen 0.5°C (ver Tabla 2) entre ellos.

Tabla 2: *Tiempo de esterilización y temperatura de incubación para la valoración de cada vitamina*

	Biotina	Vitamina B_{12}	Ácido fólico
Tiempo de esterilización (a 121°C)	10 minutos	5 minutos	5 minutos
Temperatura de incubación	30°C	34°C	34°C

Finalizada la incubación, se retiran los tubos del baño termostático y se colocan en refrigerador para interrumpir el crecimiento.

Previamente a la lectura estos tubos deben llevarse a temperatura ambiente. Finalmente se mide la transmitancia en espectrofotómetro a 570 nm, utilizando el blanco sin inocular como 100% de transmitancia.

Se calcula el contenido de vitamina aplicando el estadístico apropiado. El diseño presentado en este trabajo es el de rectas paralelas.

El cálculo estadístico se encuentra en la Farmacopea Europea con el título Análisis estadístico – Modelo de líneas paralelas.[3]

Para que la valoración sea satisfactoria deben cumplirse los siguientes requisitos:

- Los blancos inoculados, los cuales sólo contienen medio de cultivo y el microorganismo correspondiente, no debe mostrar crecimiento. Si se observara que estos blancos se encuentran contaminados, se podrá concluir que se está en presencia de algún inconveniente con el agua, el medio o el microorganismo utilizado.
- Se obtendrán dos líneas correspondientes al estándar y a la muestra. Estas líneas deben mostrar regresión, linealidad y paralelismo. Estas características son verificadas mediante el cálculo estadístico. Si alguna de las tres no cumpliera con la especificación, el ensayo es considerado inválido y deberá repetirse.

Si el ensayo es válido, se calcula el contenido de vitamina por unidad de producto, y el intervalo de confianza, el cual debe hallarse dentro del 15%.

Las valoraciones se realizan por duplicado. El resultado final es el promedio de los dos valores obtenidos, los cuales se consideran promediables si su desviación estándar porcentual es como máximo 15%. Si la diferencia es mayor a este valor, se repite la experiencia, obteniéndose otros dos nuevos valores.

En general se utiliza el cálculo de tres dosis, pero es posible utilizar un cálculo estadístico con dos dosis si, se ha realizado la validación del método y la curva dosis respuesta que asegura que nos encontramos dentro del rango de linealidad y regresión (opción a ser evaluada por autoridades del país).

Curva dosis- respuesta

Previamente a comenzar con el ensayo de valoración de vitaminas como fue expuesto en “Procedimiento del ensayo” debe determinarse en qué zona de la curva de crecimiento se debe trabajar. Con esta finalidad se realiza una curva dosis-respuesta.

Procedimiento para realizar curva dosis-respuesta

Se toman 10 concentraciones de estándar con un factor de dilución de 1:2 (por ejemplo) entre cada una de ellas. Se cargan tubos de ensayo por cuadruplicado con 100 µl de cada una de las 10 concentraciones. Se agrega 9.9 ml de medio de cultivo preparado según tabla 1. También se preparan los cuatro tubos de blanco (dos de ellos para ser inoculados y otros dos para utilizar de blancos en la lectura en espectrofotómetro)

Se continua con el mismo procedimiento expuesto en “Procedimiento de ensayo” y finalmente se leen sus transmitancias. Se obtienen 4 lecturas de transmitancias por cada una de las 10 concentraciones. Se expresan las transmitancias en absorbancias. Se promedian estos 4 valores de tal forma de obtener un valor de absorbancia por cada concentración. Ver Tabla 3.

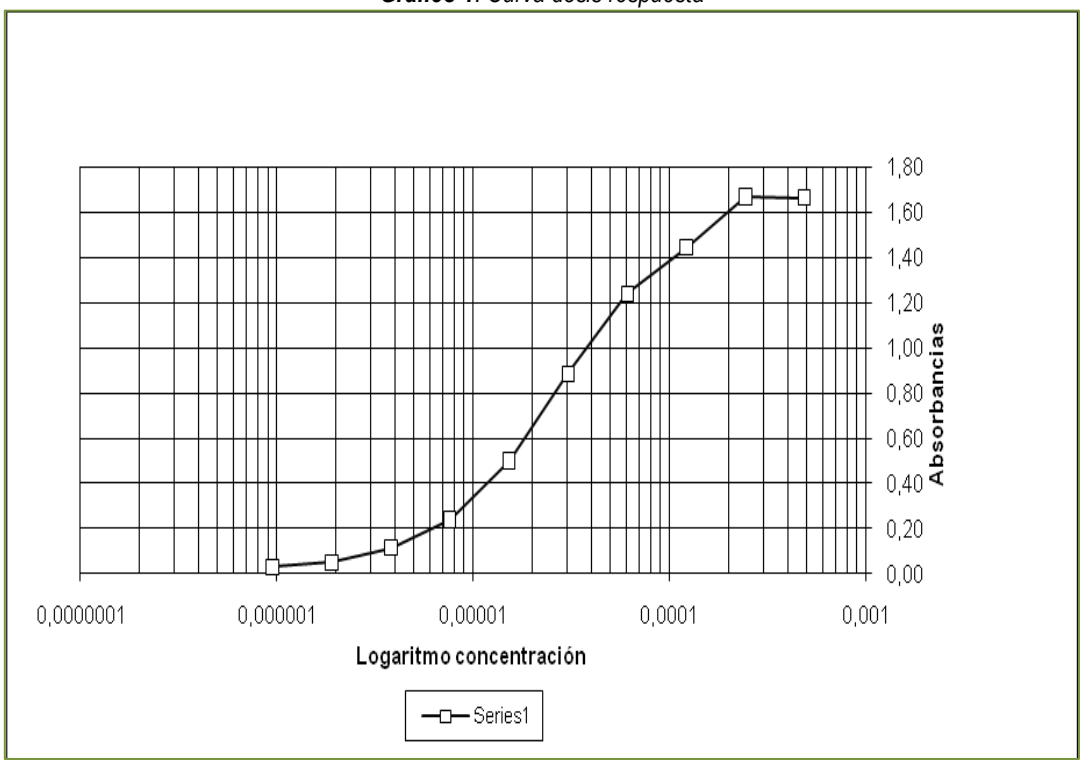
A partir de esta información se puede graficar absorbancias en función de logaritmo de la concentración (Ver Gráfico 1). También se puede aplicar el cálculo estadístico para evaluar en que rango de esta curva se cumplen las especificaciones de regresión y linealidad.

En el Gráfico 1 se observa que existen dos zonas donde no se observa regresión. Esto es a concentraciones muy bajas o concentraciones muy altas.

***Tabla 3**: Curva dosis respuesta*

Concentración de vitamina X por tubo expresada en mcg/ml									
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
4,9E-04	2,4E-04	1,2E-04	6,1E-05	3,0E-05	1,5E-05	7,6E-06	3,8E-06	1,9E-06	9,5E-07
Resultados obtenidos:									
Transmitancias									
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
2,13	2,145	3,169	7,536	15,791	30,45	52,907	80,84	87,544	90,288
2,025	2,231	3,723	5,293	12,73	37,625	61,389	76,91	83,218	96,413
1,997	2,171	4,118	4,823	11,259	29,813	60,754	75,385	92,57	97,116
2,513	2,007	3,445	5,714	12,688	28,996	55,756	74,245	93,063	89,58
Absorbancias									
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1,67	1,67	1,50	1,12	0,80	0,52	0,28	0,09	0,06	0,04
1,69	1,65	1,43	1,28	0,90	0,42	0,21	0,11	0,08	0,02
1,70	1,66	1,39	1,32	0,95	0,53	0,22	0,12	0,03	0,01
1,60	1,70	1,46	1,24	0,90	0,54	0,25	0,13	0,03	0,05
Promedio de las absorbancias									
1,67	1,67	1,44	1,24	0,89	0,50	0,24	0,11	0,05	0,03

***Gráfico 1**: Curva dosis respuesta*



Cálculo estadístico para determinar rango de concentraciones donde se debe trabajar.

Aplicar el estadístico nombrado en el punto "Procedimiento del ensayo" teniendo en cuenta los términos correspondientes a estándar, evaluando sólo la regresión y linealidad.

A partir de esta información se diagrama el ensayo de rutina, teniendo en cuenta cuál es el rango lineal y que presenta regresión en la curva.

Validación del método de valoración microbiológica

Definiciones:

- *Validación*: Es el proceso por el cual mediante estudios en el laboratorio se prueba que un método es adecuado para la aplicación analítica al que está destinado.
- *Especificidad*: Es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera puedan estar presentes.
- *Rango*: es el intervalo en el cual, en el caso de valoración microbiológica, cumple con regresión, linealidad, paralelismo y precisión.
- *Precisión*: Es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa de una serie de mediciones.

  La precisión puede ser tomada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto (la valoración es realizada en un mismo día por un solo analista). La precisión intermedia expresa las variaciones dadas en: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos)

Procedimiento de validación del método de valoración microbiológica

- Especificidad:

  Se puede considerar que la especificidad de este método está dada por los microorganismos utilizados en la determinación de cada vitamina.

- Linealidad, regresión y paralelismo

  Al realizar un ensayo de estándar y muestra, y aplicar el estadístico de rectas paralelas para tres dosis por triplicado, debe verificarse el cumplimiento de una regresión significativa y las rectas deben ser paralelas y lineales dentro de un determinado rango. Estas condiciones deben verificarse mediante pruebas de validez para una determinada probabilidad, generalmente p=0,05

- Rango:

  Debe documentarse el rango para el cual el método cumple con la especificación para regresión, paralelismo y linealidad.

- Precisión:

  - Repetibilidad: La valoración es realizada sobre un lote de producto por sextuplicado, por un solo analista en un mismo día

  - Precisión intermedia: La valoración es realizada sobre el mismo lote de producto por sextuplicado, en seis días distintos y distintos analistas.

En cada caso, se obtienen 6 resultados, los cuales no deben diferir en más de 7.5% en su desviación estándar porcentual para que el método se considere validado.

Bibliografía recomendada:

1. *Analytical Microbiology* – edited by Frederick Kavanagh (1963)
2. *Analytical Microbiology* – edited by Frederick Kavanagh (1972) Volumen II
3. Farmacopea Europea – capítulo 5.3

Capítulo V.7.

Control Microbiológico de Cosméticos

Esteban Zarankin

Introducción

Fuentes de contaminación

Deterioro microbiano

Conservadores

Parámetros de control microbiológico

Control higiénico

Bibliografía

Introducción

Según la Resolución N° 155/98 ANMAT, se entiende como productos cosméticos para la higiene personal y perfumes, a aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiar su apariencia, protegerlas o mantenerlas en buen estado y/o corregir olores corporales. Estos productos no podrán proclamar actividad terapéutica alguna. <1>

La mayoría de los productos cosméticos, debido a que contienen un elevado porcentaje de agua o extractos de origen vegetal, y que muchas de las sustancias utilizadas en su formulación pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, son productos susceptibles a contaminaciones microbiológicas. La presencia de microorganismos en los productos cosméticos puede producir cambios en el aspecto físico, color, olor y textura, y puede representar un riesgo para la salud del consumidor.

Los factores principales que inciden en que los microorganismos puedan proliferar en los productos cosméticos están vinculados a las características del producto, cantidad de microorganismos que contaminan el producto, el material de empaque primario, temperatura de almacenamiento y proceso de elaboración y envasado.

Las características del producto son de suma importancia ya que, si los microorganismos no pueden sobrevivir o proliferar debido a las condiciones que encuentran en los mismos, difícilmente presente un problema. Entre las características del producto que influyen en forma directa podemos nombrar la disponibilidad de agua o actividad acuosa (Aw), el pH, contenido de nutrientes, el potencial de óxido reducción y la presión osmótica.

Fuentes de contaminación:

Normalmente el origen de la contaminación de los productos cosméticos proviene de alguna o algunas de las siguientes fuentes: materia prima, medio ambiente, equipos utilizados durante la elaboración y envasado, material de empaque primario, o personal que manipula el producto.

Materias primas

Las materias primas de origen natural como minerales y principalmente productos derivados de origen animal y extractos vegetales, con frecuencia son más propensos a la proliferación microbiana que las materias primas de origen sintético.
El agua es uno de los ingredientes más extensamente usados y es responsable de la mayoría de los casos de contaminación; por lo cual el control periódico del agua (independientemente del origen) es de suma importancia.
La identificación y control microbiológico de todas las materias primas que pueden originar una contaminación microbiológica debe ser la primera barrera para evitar que los microorganismos entren en contacto con el producto.

Medio ambiente

En el aire se encuentran en suspensión gran cantidad de microorganismos en forma vegetativa y esporulada. El manejo adecuado de las áreas donde el producto queda expuesto es importante para evitar que los microorganismos entren en contacto con el producto. Aunque en la práctica no es una causa habitual de contaminación, puede ser que los microorganismos involucrados, en ciertas condiciones favorables, proliferen en el producto.

Equipos utilizados durante su elaboración y envasado

Los equipos son una fuente común en la contaminación de los productos cosméticos. Las principales causas de que esto ocurra están relacionadas con la insuficiente limpieza en áreas que tienen contacto con producto. Es importante que luego de la limpieza los equipos queden completamente secos y tapados
El tipo de microorganismo que se desarrolla en tales áreas depende de los nutrientes disponibles y de las condiciones ambientales, especialmente del pH y de la temperatura.
Es imprescindible evitar la formación de *biofilms*, ya que los mismos son muy difíciles de erradicar y generan una fuente constante de microorganismos capaces de contaminar los productos que se elaboran y/o envasan. Es recomendable realizar validaciones de limpieza para todos los equipos involucrados en los procesos de elaboración y envasado.

Material de empaque primario

Los envases de plástico y vidrio usualmente poseen un bajo número de microorganismos, pero como resultado de un acondicionamiento deficiente es posible que contengan bacterias esporuladas como *Bacillus* spp o esporas de hongos como *Penicillium* spp o *Aspergillus* spp. Es recomendable que el material de empaque primario almacenado se acondicione en depósitos que cuenten con procedimientos de limpieza que minimicen el polvo ambiental.

Personal que manipula el producto

Es necesario un estricto control de los procedimientos para evitar que los microorganismos puedan ser transferidos a los productos desde el personal que trabaja en la elaboración y/ o envasado. Esto constituye un grave peligro ya que de esta manera un producto puede contaminarse con microorganismos patógenos como por ejemplo *Staphylococcus aureus* que puede estar presente en la piel, y *Escherichia coli* debido a una inadecuada higiene personal.
Es necesario cumplir con un monitoreo de guantes y llevar un estricto control del personal que está autorizado para ingresar a las áreas productivas.

Deterioro microbiano:

Como consecuencia del crecimiento microbiano pueden producirse las siguientes alteraciones del producto:

- Cambio de color.
- Sedimentación
- Producción de malos olores.
- Separación de fases en las emulsiones.
- Alteración de las propiedades reológicas
- Observación directa de microorganismos
- Disminución de la viscosidad.

Conservadores:

La mayoría de los productos cosméticos tienen conservadores (agentes antimicrobianos de diversa naturaleza) que evitan que los microorganismos proliferen en ellos.

Características que debe tener un conservador:

- Amplio espectro (actividad contra hongos, levaduras, bacterias Gram positivas y Gram negativos)
- Tiene que ser soluble en cualquier fase de la formulación (acuosa u oleosa).
- Eficiente a bajas concentraciones
- Ser completamente estable
- Ser incoloro e inodoro
- Tener un rango de pH amplio
- Compatible con la formulación y con todos los ingredientes que la forman.

Conservadores utilizados habitualmente en la industria cosmética:

Ácidos:
– Ácido benzoico y sus sales
– Ácido dehidroacético y sus sales
– Ácido p-hidroxibenzoico y sus sales y ésteres (parabenos)
– Ácido sórbico y sus sales

Alcoholes
– Alcohol bencílico
– Alcohol 2,4-diclorobencílico

Derivados fenólicos
– Fenoxietanol
– Triclosán

Donadores de formaldehído
– Diazolidinil urea
– Imidazolidinil urea
– Quaternium-15
– DMDM hidantoína

Otros
– Clorometilisotiazolinona + metilisotiazolinona

Tabla 1: *Conservadores habitualmente utilizados y sus agentes neutralizantes.*

CONSERVADORES	AGENTES NEUTRALIZANTES
Alcoholes	Dilución - Tween 80
Aldehídos	Dilución - Bisulfito de sodio
Amonio cuaternario	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Benzoatos	Dilución – Tween 80
Dowicide 200	Lecitina, aniónicos, no iónicos, talco, CMC.
Germall (II-115)	No iónicos, bentonita, CMC.
Hidrogeno peróxido	Catalasa
Kathon CG	Dilución
Parabenos	pH >8; Tween 80
Triclosán	Lecitina -Tween 80

Es necesario evaluar la efectividad de los conservadores en el producto. Para ello se recomienda realizar dichos ensayos según USP <2> o CTFA <3>. La efectividad de los conservadores se evalúa inoculando el producto con un microorganismo o con un pool de ellos según la técnica utilizada. El producto se debe conservar a temperatura ambiente o a temperaturas especificadas durante un cierto período de tiempo prefijado hasta 28 días, examinándose periódicamente para contabilizar los microorganismos sobrevivientes en cada tiempo señalado.

Para evitar que los conservadores impidan que los microorganismos sean recuperados del producto, la elección de los agentes neutralizantes es crítica. En la Tabla 1 se encuentra un listado de conservadores habitualmente utilizados en la industria cosmética y los agentes neutralizantes que se pueden utilizar

Otro procedimiento de neutralización de conservadores incluye la filtración por membrana.

PARAMETROS DE CONTROL MICROBIOLOGICO:

En la Argentina los Controles Higiénicos deben cumplir con la Disposición 1108/99 (Anexo II) <4>, según Tabla 2.

Tabla 2. *Disposición 1108/99. Anexo II. ANAMAT*

	ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
TIPO - I	Productos para uso infantil Productos para área ocular Productos que entran en contacto con mucosa	a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales, no más de 10^2 UFC/g o ml. Límite máximo 5 x 10^2 UFC/ g o ml. b) Ausencia *de Pseudomonas aeruginosa* en 1 g o ml c) Ausencia de *Staphylococcus aureus* en 1 g o ml. d) Ausencia de Coliformes totales y fecales en 1 g o ml. e) Ausencia de Clostridios sulfito reductores en 1 g*
TIPO - II	Demás productos susceptibles de contaminación microbiológica	a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales, no más de 10^3 UFC/g o ml. Límite máximo 5 x 10^3 UFC/ g o ml. b) Ausencia *de Pseudomonas aeruginosa* en 1 g o ml c) Ausencia de *Staphylococcus aureus* en 1 g o ml. d) Ausencia de Coliformes totales y fecales en 1 g o ml. e) Ausencia de Clostridios sulfito reductores en 1 g*

* Exclusivamente para productos que contienen talcos

Control Higiénico de productos cosméticos:

Los controles higiénicos de los productos cosméticos se pueden realizar mediante métodos tradicionales, basados en el enriquecimiento, incubación y aislamiento o basado en métodos rápidos, entre los principales se encuentra la bioluminiscencia y la citometría de flujo.

Los métodos rápidos pueden proporcionar resultados confiables en un periodo menor de tiempo. Se podrá encontrar más información sobre los métodos rápidos en este manual.

Antes de determinar la metodología que se usara para el control higiénico, es importante ver la aptitud de las técnicas microbiológicas. Esta se basa en demostrar de que, ni el material a ensayar, ni el ensayo al que se

somete la muestra inhiben la multiplicación y/o la detección de los microorganismos que pudieran estar presentes en ella. Se podrá encontrar más información en el capítulo V.4.

Procedimiento para el Control higiénico tradicional:

Materiales y equipos:

1. Pipetas graduadas, estériles de 2 ml, 5 ml y 10 ml.
2. Recipientes estériles.
3. Placas de Petri de 14 x 90 mm estériles.
4. Varillas de vidrio estériles
5. Tubos de ensayo de 14 x 90 mm estériles.
6. Paños absorbentes.
7. Instrumentos, pinzas, tijeras, bisturíes, hojas de bisturí, espátulas estériles.
8. Balanza con sensibilidad 0.01 g
9. Estufas de incubación reguladas de 27.5 ± 1 °C y 35 ± 1 °C.

Medios de cultivo y soluciones:

- Agua peptonada 0.1 % con antagonista adecuado según ensayo de aptitud
- Caldo triptona soya (TSB).
- Caldo Tioglicolato con indicador (productos que contienen talco)
- Caldo verde brillante bilis 2 % (CVB).
- Agar EMB levine (EMB)
- Agar Manitol salado, Agar Vogel-Johnson o Agar Baird Parker.
- Agar Cetrimide. (AC)
- Agar triptona soya (TSA).
- Agar papa glucosado (APG)
- Medios de cultivo para pruebas bioquímicas y/o sistemas de identificación de microorganismos.
- Solución fisiológica.

Reactivos:

- Tween 20
- Agua destilada
- Alcohol etílico 70º
- Plasma de conejo
- Colorantes para coloración de Gram
- Reactivos para revelar pruebas bioquímicas
- Parafina estéril

Manipulación de muestras:

A continuación se detallan recomendaciones para el manipuleo correcto de las muestras.

- Analizar las muestras lo más pronto posible luego de su llegada al laboratorio. Si fuese necesario almacenarlas, hacerlo a temperatura ambiente.
- Inspeccionarlas cuidadosamente antes de abrirlas verificando las irregularidades de sus envases.
- Desinfectar el exterior del envase con una solución 70 % etanol (v/v) + 1 % HCl (v/v) o algún otro desinfectante de amplio espectro que no ataque el material de empaque [5]. De ser necesario se debe secar el envase con una gasa o paño estéril.
- Para cada análisis microbiológico, es preciso utilizar una porción representativa del contenido de la muestra. Usar una porción de 10 g o ml
- Si hubiere necesidad de análisis múltiples, estudios microbianos, toxicología y química, la submuestra para el examen microbiológico deberá ser retirada en primer lugar.

Preparación de la muestra:

En la preparación de la muestra a ser ensayada, no deberá producirse alteración del número o tipo de microorganismo originalmente presente.

Se tomará de un envase 10 g o ml de muestra, si es necesario analizar varios envases que contengan el mismo producto y que provengan del mismo lote, se procederá a la extracción de una fracción equivalente de cada envase hasta completar los 50 g o ml de muestra en un vaso de precipitado estéril, y se homogeneizará. Esta mezcla será considerada la muestra.

La muestra deberá ser removida asépticamente, transfiriendo 10 g o ml a un recipiente estéril para cada una de las pruebas descriptas.

Preparación de la solución / suspensión madre:

Muestras líquidas: Se debe agregar 10 ml en 90 ml del diluyente que contenga los agentes neutralizantes de los conservadores (dilución 10^{-1}), homogeneizar y colocar durante 10 minutos a 35 ± 1 ºC.

Muestras sólidas / semisólidas: Se debe agregar 10 g en 90 ml del diluyente que contenga los agentes neutralizantes de los conservadores (dilución 10^{-1}) utilizando un agitador Vortex homogeneizar y colocar durante 10 minutos a 35ºC ± 2 ºC.

Es recomendable utilizar perlas de vidrio estériles para facilitar la dispersión de la muestra en el diluyente

Método de recuento en placa:

Tomar 5 ml de la solución madre y se pipeteará 1 ml en 4 placas de Petri estériles y en un tubo que contenga 9 ml de solución fisiológica (SF). Se agregará rápidamente a dos placas 10 ml de medio TSA, y a las otras dos 10 ml del medio (APG), que se han sido previamente fundidos y enfriados a 45ºC. Se repetirá la metodología anterior, dos veces más hasta llegar a una dilución 1/100 de la solución madre. Se cubrirán las placas de Petri y se mezclarán por rotación, se dejarán solidificar a temperatura ambiente.

Se invertirán las placas de TSA para incubarlas por 48 horas a 35 ± 1 ºC. Las placas de APG se incubarán sin invertirse durante 5 días a 27.5 ± 1 °C. Luego de la incubación se examinará el crecimiento en las placas, se contará el número de colonias y se expresará el promedio de las dos placas en términos de número de microorganismos por g o ml de muestra. El número de unidades formadoras de colonias por placa para ser considerada deberá ser mayor a 25 y menor a 250. Multiplicar por el factor de dilución para expresar los resultados

Si no se contaran colonias en la dilución 10^{-1} se expresará el resultado como "<10 unidades formadoras de colonias por g o ml de muestra". Se recomienda realizar un control negativo utilizando solo PLP o el diluyente utilizado.

Test para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*:

Se tomarán 10 ml de la solución madre y se los agregará a 90 ml de TSB. Se mezclará e incubará a 35 ± 1 ºC durante 48 horas. Se examinará el medio para detectar crecimiento, y si este está presente, se repicará en superficie con ansa en una placa de petri con los medios Vogel-Johnson-agar y Cetrimida agar. Se cubrirán, invertirán e incubarán las placas a 35ºC ± 1 ºC por 48 horas.

Si luego de la incubación ninguna de las colonias desarrolladas tiene las características detalladas en las Tablas 3 o 4, la muestra cumplirá con los requerimientos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Si se detectara colonias sospechosas se realizarán los test de coagulasa y oxidasa respectivamente, y se utilizarán otros medios selectivos.

Tabla 3: *Características de Staphylococcus aureus en medios selectivos*

Medio selectivo	Agar Vogel-Johnson	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker
Características Morfológicas	Colonias negras rodeadas de un halo amarillo	Colonias amarillas con halo amarillo	Colonias negras brillantes con halo claro de 2 a 5 mm
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en racimos	Cocos Gram positivos en racimos	Cocos Gram positivos en Racimos
Test de coagulasa	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 4: *Características de Pseudomonas aeruginosa en medios selectivos*

Medio selectivo	Agar Cetrimide	Agar F para *Pseudomonas* Detección de fluoresceína	Agar P para *Pseudomonas* Detección de piocianina
Características Morfológicas	Colonias generalmente verdes	Generalmente incolora a amarilla	Generalmente Verdosas
Fluoresceína Luz UV	Verde	Amarilla	Azul
Test de oxidasa	Positiva	Positiva	Positiva
Coloración Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos

Prueba de la coagulasa para *Staphylococcus aureus:*

Con la ayuda de un ansa de cultivo, se transferirán las colonias sospechosas desde la superficie de agar Vogel Johnson o Baird Parker o Manitol salado a tubos de hemólisis que contengan cada uno 0,5 ml de plasma de conejo recién extraído. Se incubarán en baño de agua a 37± 1 ºC examinando los tubos a las 3 horas y subsiguientemente a intervalos regulares hasta 24 hs. Se realizarán controles positivos y negativos simultáneamente con la muestra problema.

Prueba de oxidasa y de pigmentos para *Pseudomonas aeruginosa:*

A partir del agar Cetrimide se sembrará con ansa en placa de petri con los medios para detectar fluoresceína y piocianina. Incubar a 35º ± 1 ºC por un período de tiempo no inferior a 3 días.

Se examinarán las estrías de crecimiento a la luz UV. Observando las características descriptas en la tabla 2. Se hará la prueba de oxidasa con el crecimiento sospechoso, y se transferirán esas colonias a discos de papel de filtro que han sido impregnados con diclorhidrato de N,N dimetil-p-fenilendiamina. La observación de un color rosa, cambiando a púrpura indicaría que la prueba de oxidasa es positiva.

Test para bacterias coliformes:

Se tomarán 10 ml de la solución madre y se agregarán a un tubo que contenga 10 ml de CVB en doble concentración con una campana de Durham, se incubarán a 35 ± 1 ºC por 48 hs. El medio se examinará para ver la presencia o ausencia de gas dentro de la campana, si el gas estuviera presente, se tomará una anzada, y se repicara en un tubo de CVB con 10 ml y campana de Durham en concentración simple a 44ºC por 48 hs. para

detectar presencia de coliformes fecales. Si se presentará gas en la campana de Durham se sembrará una placa de EMB a 35 ± 1 ºC durante 48 hs y se identificarán las colonias sospechosas.

La identificación microbiana puede realizarse por pruebas biquímicas o con sistemas de identificación fenotípica.

Conclusión:

Batallamos contra el ejército más numeroso que jamás se haya visto en la tierra, con un poder de adaptación envidiable. Los microorganismos estaban antes que nosotros y seguirán cuando no estemos. En nuestro trabajo es posible automatizar ciertos procesos, pero siempre va a ser necesario el criterio y análisis del microbiólogo.

Bibliografia:

1. Resolución 155/98 (M.S. y A.S.) Artículo 2°. 1998
2. United States Pharmacopeia. USP. 34 ed. 2011.
3. CTFA-Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Microbiology Guidelines. Curry A., McEwen (eds.) Washington D.C.
4. Disposición 1108/99. ANMAT. Anexo II. 1998
5. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 23. 8th.ed. 2001

Capítulo V.8

Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos

Luis Jiménez

Introducción

¿Por qué los métodos rápidos son una alternativa a los métodos convencionales o estándar?

Tecnologías:

- *Bioluminiscencia de ATP*
- *Conteo Directo de Células Viables*
- *Citometría de Flujo*
- *Impedancia y Producción de Gas*
- *Tecnología de PCR*
- *Identificación Genética por secuenciación del ADN*
- *Microarreglos de ADN*
- *Inmunoensayos*
- *Autofluorescencia*
- *Prueba de endotoxinas*

Cómo Validar un Método Rápido

Conclusión

Introducción

Con la creciente demanda para optimizar la fabricación y las pruebas de control de calidad de procesos farmacéuticos, los métodos microbiológicos rápidos se han utilizado para analizar las muestras del medio ambiente, materias primas, productos intermedios, procesos, y muestras de productos terminados. El objetivo de este capítulo es describir los diferentes tipos de tecnologías, métodos y protocolos disponibles para los microbiólogos farmacéuticos que trabajan en la investigación y en el control de calidad de productos farmacéuticos. La discusión se limitará a los estudios, trabajos de validación y protocolos publicados en la literatura científica.

Diferentes capítulos de las farmacopeas internacionales describen los métodos de prueba necesarios para analizar productos estériles, productos farmacéuticos no estériles, y la vigilancia ambiental [1-5]. Sin embargo, estos no son los únicos métodos para las pruebas de control de calidad de las muestras de productos farmacéuticos. Hay varias tecnologías que pueden utilizarse para este tipo de análisis. Sin embargo, para aplicar estas tecnologías para las pruebas de rutina, los estudios de validación deben llevarse a cabo para documentar y apoyar la equivalencia con los métodos de compendio. Los capítulos informativos de la USP y UE [6, 7] describen los parámetros necesarios para demostrar la equivalencia con los métodos de compendio. Además, otras directrices para la validación de métodos rápidos han sido publicados por la *Parenteral Drug Association* (PDA) [8].

A pesar del interés por la industria y los organismos reguladores, los métodos rápidos se dirigen lentamente a formar parte de la rutina de análisis microbiológico de control de calidad de productos farmacéuticos. Hay algunas

iniciativas de los organismos reguladores para promover el uso de estas tecnologías para optimizar el control del proceso y las pruebas de control de calidad. Estas tecnologías se pueden dividir en tres categorías diferentes. La primera categoría es una de crecimiento microbiano basado en una señal que puede ser detectada después de una etapa de enriquecimiento. La bioluminiscencia de Adenosina Trifosfato (ATP) es un ejemplo de esta categoría. La segunda categoría es la detección directa de las células microbianas que pueden ser visualizadas y diferenciadas mediante citometría de flujo. La tercera categoría es el análisis de componentes celulares, donde la detección de un componente específico de la célula indicará la presencia de los microorganismos. Un ejemplo de esta categoría es el análisis de sustancias de endotoxinas o secuencias específicas de ADN.

¿Por qué los métodos rápidos son una alternativa a los métodos convencionales o estándar?

Cuando los microorganismos contaminan los productos farmacéuticos, los métodos estándar se realizan para cuantificar, detectar, o identificar el número y tipo de microorganismos presentes en un lote determinado [9,10].

Los métodos estándar se basan en el enriquecimiento, la incubación y el aislamiento de los microorganismos de las muestras de productos y ambientales. Debido a los largos tiempos de incubación, la manipulación continua, y el tiempo de los procedimientos, los resultados se obtienen normalmente dentro de 6-8 días. Se ha informado recientemente de que los métodos estándar subestimaron las comunidades microbianas presentes en los ambientes farmacéuticos y cuartos limpios [11,15]. Esto ha sido demostrado en las muestras de agua, placas de contacto de las superficies, y muestras de aire de diferentes instalaciones de fabricación de productos farmacéuticos y los entornos de cuartos limpios. La bioluminiscencia de ATP, los conteos viables, la tecnología de autofluorescencia, análisis del ADN y las técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) han demostrado que una parte no cultivable de la comunidad microbiana en ambientes farmacéuticos es viable y no es detectada por los métodos convencionales. Por lo tanto, estas nuevas tecnologías proporcionan una resolución más alta y mantienen una mayor discriminación entre las especies microbianas. La información precisa de los tipos y número de microorganismos en ambientes farmacéuticos dará lugar a la aplicación de los procesos que minimicen la distribución microbiana, la viabilidad y la proliferación.

Por otra parte, la identificación de varios aislamientos ambientales de los ambientes farmacéuticos utilizando los métodos convencionales de identificación ha demostrado ser incorrecta (Tabla 1). La identificación se realiza mediante técnicas bioquímicas (fenotípica), los lípidos y/o análisis de ADN. Los análisis de ADN proporcionan la mejor reproducibilidad, sensibilidad, precisión y resolución. Para desarrollar las medidas correctivas adecuadas cuando resultados fuera de la especificación son obtenidos, la identificación microbiana precisa es necesaria si la fuente de contaminación tiene que ser determinada. Una acción correctiva no es eficaz si la información incorrecta se utiliza para implementarla.

Sobre la base de estos estudios es evidente que en algunos casos, los métodos convencionales no son exactos y precisos para contribuir al proceso de la optimización de la manufactura, análisis, y lanzamiento. Aunque los métodos estándar son valiosos y aportan información sobre los números, géneros microbianos, y las especies, estos métodos fueron desarrollados para la identificación de microorganismos en muestras clínicas [16]. La mayoría de las muestras clínicas se originan a partir de fluidos o tejidos humanos, que son ricos en nutrientes y con temperaturas de exposición de 35-37 °C. Las muestras ambientales, por ejemplo, materias primas, productos terminados, aire, agua, equipos de hisopos y placas de contacto, tomado de las instalaciones de producción no son ricos en nutrientes (oligotróficas) y la temperatura fluctúa por debajo y por encima de la temperatura ambiente. La actividad baja de agua y cambios dramáticos en el pH también afectan al estrés microbiano. Por otra parte, la fabricación de productos farmacéuticos abarca procesos físicos, tales como mezcla, compresión, filtrado, calefacción, encapsulación, granulación, recubrimiento y secado [17]. Estos procesos exponen a las células microbianas a un estrés ambiental continuo.

Tabla 1. *Caracterización microbiana de bacterias utilizando diferentes sistemas de identificación.*

Especies	Fenotípica 1	Fenotípica 2	Lípidos	Genética
Bacillus cereus	no	si	si	si
Burkholderia cepacia	si	no	si	si
Enterobacter cloacae	si	si	no	si
Escherichia coli	si	si	si	si
Micrococcus luteus	no	si	no	si
Pseudomonas aeruginosa	si	si	si	si
Shigella flexneri	no	si	no	si
Staphylococcus aureus	no	no	no	Si
Staphylococcus epidermidis	si	no	no	Si
Ochrobactrum anithropi	si	si	si	Si
Ralstonia pickettii	no	si	no	Si
Streptococcus salivarius	no	no	no	Si
Corynebacterium xerosis	no	no	no	Si
Kokuria rosea	no	no	no	Si

Los microorganismos sobreviven en esas condiciones por la adaptación a la falta de nutrientes y otras fluctuaciones del medio ambiente mediante la realización de diferentes estrategias de supervivencia [18]. Los microorganismos no siempre son metabólicamente activos y su reproducción no es constante. Por ejemplo, las bacterias gram-positivas, tales como *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. desarrollan estructuras latentes llamadas esporas. Por otra parte, las bacterias gram-negativas como *E. coli*, *S. typhimurium* y otros bacilos gram-negativos convierten en células viables pero no cultivables (VNC). Estas células bacterianas que no crecen en las placas de cultivo, pero mantienen su viabilidad, pasan por la etapa viables no cultivables, pero aún son capaces de causar infecciones graves para los seres humanos. Varios estudios han demostrado que las células microbianas en ambientes farmacéuticos han cambiado el tamaño de la célula, los perfiles enzimáticos y fisiológicos como una respuesta a las fluctuaciones del medio ambiente [19-21]. Estas respuestas son inducidas por el estrés y permiten a los microbios reparar el daño causado. Respuestas similares han sido reportadas por las bacterias expuestas a las soluciones de drogas causando importantes cambios morfológicos y de tamaño. Las células bacterianas cargadas en diferentes tipos de productos inyectables han demostrado diversos cambios en su metabolismo, los perfiles enzimáticos, y los cambios estructurales que interferían con su identificación mediante pruebas bioquímicas normalizadas. Además, las bacterias que pasan por una etapa de hambre de supervivencia son capaces de penetrar filtros de 0.2 / 0.22 micrones que se supone que deben retener todas las especies bacterianas.

Por lo tanto, el uso de perfiles enzimáticos y la asimilación de carbono, para discriminar y identificar los microorganismos de las muestras del medio ambiente podría, en algunos casos resultar en perfiles desconocidos que no proporcionarán ninguna información significativa sobre los géneros y especies microbianas presentes. En los ambientes farmacéuticos, la información sobre los géneros y especies de un contaminante microbiano proporcionará información valiosa sobre las posibles fuentes de contaminación que llevaran a que se puedan implementar acciones correctivas efectivas.

También se ha demostrado que la recuperación de los microorganismos a partir de muestras ambientales, incluyendo entornos de cuartos limpios se ha mejorado mediante el uso de los medios de cultivo de bajos nutrientes [12]. La recuperación de los microorganismos de las muestras de agua farmacéutica se incrementa por el uso de un medio de cultivo bajo nutrientes como el medio de R2A [22]. La necesidad de una fase de recuperación del estrés se demuestra por los tiempos de incubación más largos y medios bajos de nutrientes. En el caso de las esporas bacterianas dañadas por el calor, la recuperación y el crecimiento se basa en la composición de los medios de cultivo, el pH, la temperatura de incubación, y el tiempo de incubación. Aunque el desarrollo y la aplicación de las actuales buenas prácticas de manufactura (siglas en inglés, cGMP) ha mejorado el control de procesos en ambientes farmacéuticos, la contaminación microbiana sigue siendo una de las principales causas de retirada de

productos en todo el mundo. Algunas de las razones de la falta de cumplimiento de las directrices cGMP son:

• Las malas prácticas de saneamiento
• La falta de personal
• La falta de formación
• La falta de recursos
• Falta de instalaciones para las pruebas de control de calidad
• Ausencia de proceso de validación
• Ausencia de proceso de documentación
• La falta de comprensión de los principios básicos microbiológicos

Cuando los productos están contaminados, el crecimiento microbiano tendrá un impacto negativo en la integridad del producto creando una grave amenaza sanitaria para los consumidores. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar y aplicar métodos rápidos microbiológicos. Los métodos rápidos han demostrado ser sensibles, precisos, robustos, y proporcionan resultados más rápidos que pueden indicar problemas en los procesos y sistemas utilizados en ambientes farmacéuticos. La detección temprana de contaminación microbiana permite la minimización de las pérdidas de producción y optimización de la evaluación de riesgos.

Las buenas prácticas de fabricación son un proceso dinámico y continuo que se basan en la aplicación de los últimos avances tecnológicos para la manufactura de productos farmacéuticos con el fin de ofrecer productos eficaces y seguros. El análisis de control de calidad es uno de los aspectos más importantes de los procesos de control de productos farmacéuticos. Por lo tanto, reduciendo el tiempo de prueba, se aumenta el rendimiento, con un lanzamiento más rápido del producto donde se optimiza el control de los procesos.

Tecnologías

Bioluminiscencia de ATP

El ATP es el compuesto más importante de alta energía presente en una célula microbiana. El ATP tiene una importante función en la célula microbiana, proporcionando la fuente de energía para impulsar la viabilidad microbiana y el crecimiento. La tecnología de bioluminiscencia se basa en la reacción del complejo de la enzima luciferasa luciferina, en presencia de oxígeno y magnesio, con el ATP liberado de las células microbianas que resulta en la producción de luz.

$$\xrightarrow[\text{Magnesio}]{\text{Luciferasa de luciérnaga}}$$

$$ATP + D\text{-}luciferina + Oxigeno \rightarrow Luz\ MPA + PPi + Oxyluciferin + CO_2$$

La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP liberado. La emisión de luz se mide mediante a través de un luminómetro. Varios estudios han demostrado la aplicabilidad de la bioluminiscencia de ATP para el control de calidad. Los primeros estudios se han basado en la laboriosa preparación de la muestra para la extracción del ATP a partir de células microbianas y la adición manual de reactivos. Una vez que el ATP se extrae y se reacciona con la enzima, las muestras se agregan a un luminómetro para detectar la producción de luz.

Durante el durante los años 1990 las mejoras en las tecnologías de instrumentación han resultado en, la automatización completa y procesamiento de muestras múltiples, la lisis celular, y la adición de reactivos permitiendo la reducción en la manipulación de las muestras y los procedimientos largos de extracción. Algunos instrumentos han desarrollado la información cuantitativa, pero en otros sólo se indica la presencia o ausencia de células microbianas en las muestras después de una etapa de incubación.

Los ensayos de bioluminiscencia se han utilizado para el monitoreo rápido de la calidad del agua en los sistemas

farmacéuticos[23]. De todas las materias primas presentes en una formulación farmacéutica, el agua es extremadamente susceptible a la contaminación microbiana. Por lo tanto, el análisis microbiológico del agua es un parámetro crítico en el control de calidad. Los métodos estándar de análisis de agua incluyen la filtración de membrana con tiempos de incubación entre 48 horas, con placa de agar heterotrófico, o a 72 horas, con los medios de R2A.

Después de una evaluación de desempeño de 4 meses, un análisis cuantitativo de bioluminiscencia ha demostrado proporcionar un recuento total en 24 horas de las bacterias presentes en muestras de agua tomadas de un sistema de ultrafiltración de agua, sistema de circulación de agua caliente y agua fría del grifo. La correlación general entre el ensayo y los métodos estándar es mayor que 82%. Después de la filtración de membrana por el analista, el sistema al mismo tiempo lisa las células microbianas en los filtros, añade los reactivos, y determina cuantitativamente el número de células en una muestra dada. Las muestras de agua con números microbianos de 1 a 75 unidades formadoras de colonias (UFC)/ 100 ml se cuantifican con precisión. Sin embargo, la cuantificación exacta no es posible con las muestras de agua que contiene más de 75 UFC/ 100 ml. La linealidad entre el ensayo de bioluminiscencia y los métodos estándar se demuestra cuando el sistema se enfrenta con las muestras de agua contaminadas con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Otro sistema cuantitativo diferente de bioluminiscencia ha demostrado ser eficaz para el monitoreo de agua purificada y agua para inyección en una planta farmacéutica. Después de una evaluación de un mes, se obtienen recuentos comparables con el sistema y los métodos estándar [24]. Los recuentos microbianos se obtienen en 24 horas. El sistema combina un ensayo de filtración de membrana especializada con bioluminiscencia y análisis de imagen mejorada para los propósitos de cuantificación. La linearidad, precisión y reproducibilidad del sistema se ha demostrado mediante el análisis de muestras de agua contaminadas con *Burkholderia cepacia*.

Además de las aguas de calidad farmacéutica, los análisis de una gran variedad de formulaciones farmacéuticas se han validado mediante un ensayo cualitativo de bioluminiscencia. Los diferentes tipos de sistemas de administración de medicamentos farmacéuticos tales como cápsulas, tabletas, líquidos, sólidos y emulsiones fueron encontrados compatibles con el sistema. Para validar el ensayo, dos pasos se deben realizar antes de la adición de las muestras con diferentes concentraciones de microorganismos. Debido a que el enriquecimiento de las suspensiones de la muestra es necesario para llevar a cabo el análisis, el caldo de enriquecimiento debe estar libre de sustancias indígenas de ATP para evitar una reacción positiva falsa. En segundo lugar, la suspensión de la muestra en caldo no debe aumentar ni inhibir la reacción de la bioluminiscencia para indicar que la luz emitida después de la finalización del ensayo no es un artefacto, pero que sí es una señal real que registra como positivo o negativo.

Este sistema de bioluminiscencia ha demostrado que permiten la investigación de alto rendimiento de más de 180 muestras por día. Por otra parte, tiempos de 24 a 48 horas de detección fueron obtenidos para el análisis de muestras de producto terminado [25, 26]. Debido a la necesidad de una etapa de enriquecimiento de incubación, la optimización del ensayo requiere el desarrollo de diferentes medios de enriquecimiento para superar la naturaleza antimicrobiana de los diferentes principios activos farmacéuticos (Tabla 2). Por ejemplo, para una recuperación óptima de las bacterias, levaduras y hongos, en productos farmacéuticos que contienen compuestos halogenados, era necesario añadir tiosulfato de sodio a los medios de enriquecimiento o caldos (R y MR). Por otra parte, los diferentes nutrientes se añaden también para optimizar la recuperación del *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, la glicina, y para el hongo, por ejemplo, acetato de sodio y glicerol son ingredientes necesarios en los caldos R y MR (Tabla 2).

Tabla 2. *Tiempos de detección (en horas) de la contaminación microbiana por bioluminiscencia ATP.*

	Producto A		Producto B	
Medio de enriquecimiento	**R caldo**	**MR caldo**	**TAT Caldo**	**R caldo**
P. aeruginosa	24	24	24	24
S. aureus	48	24	24	24
E.coli	24	24	24	24
S. typhimurium	24	24	24	24
C. albicans	24	24	24	24
A. niger	24	27	48	27

Sin embargo algunos productos no necesitan estos caldos ya que la recuperación de las bacterias, hongos, y levaduras fueron realizadas con el caldo de Leethen/Lecithin (Tabla 3).

Tabla 3. *Tiempos de detección (en horas) de la contaminación microbiana por bioluminiscencia ATP.*

	Producto C		Producto D	
Medio de enriquecimiento	**R caldo**	**Leethen/ Lecithin**	**MR caldo**	**Leethen/ Lecithin**
P. aeruginosa	72	24	48	24
S. aureus	96	24	48	24
E.coli	48	24	48	24
S. typhimurium	72	24	48	24
C. albicans	72	24	48	24
A. niger	72	48	72	48

La optimización de la detección de contaminación microbiana en algunos productos requiere el uso de caldo Letheen con lecitina. Otro ensayo de ATP se basa en la diferenciación del ATP extracelular libre con el ATP intracelular para determinar las comunidades microbianas viable en ambientes de cuartos limpios [14]. El ATP extracelular es degradado utilizando una enzima somasa de ATP. Las muestras de los ambientes de cuartos limpios presentan niveles más bajos de ATP en comparación con las muestras obtenidas de las salas comunes. Sin embargo, una gran parte de las muestras no dan las unidades formadoras de colonias (UFC) en el medio de soja caseína, pero las placas son positivas para el ATP intracelular. La contaminación microbiana viable en cuartos limpios se puede detectar con este ensayo que podría dar una mejor indicación de la presencia de la biomasa microbiana.

Las pruebas de esterilidad se ha demostrado que se realizaron con un ensayo de bioluminiscencia, que demostró la recuperación de microorganismos en estrés [27,28]. El sistema rápido de Milliflex fue utilizado para detectar la cantidad de microorganismos presentes en una muestra. El método es basado en la regeneración de las células microbianas en los filtros con la identificación del genotipo que resultó ser robusta y reproducible. Como requisito previo para la validación de esta prueba de esterilidad rápida, se demostró que un medio sólido de cultivo promovió el crecimiento de microorganismos en estrés. Después de evaluar los diferentes medios de crecimiento, se encontró que el agar de sangre de Schaedler contiene las mejores propiedades promotoras del crecimiento entre los agares analizados para la prueba de esterilidad rápida.

Conteo Directo de Células Viables

El recuento microbiano en muestras de productos farmacéuticos se puede realizar utilizando el conteo de placas y microscopía directa con tintes de viabilidad. El recuento directo de las distintas células microbianas mediante microscopía de epifluorescencia ha demostrado que se detectan las bacterias activas en el agua purificada utilizada en los procesos de fabricación [13]. Las muestras han sido procesadas a través de un filtro de 0.45 micrones para retener las bacterias. Las bacterias en el filtro se tiñen con diferentes tipos de colorantes. Los tintes son específicos para los diferentes tipos de reacciones metabólicas en la célula microbiana. Tinción fluorescente con 5-ciano-2 ,3-cloruro de tetrazolio ditolyl (CTC) y diacetato de 6 carboxifluoresceína (6CFDA) ha detectado células bacterianas con la respiración y la actividad esterasa, respectivamente. Los resultados con el CTC y 6CFDA han indicado que gran número de bacterias en el agua purificada han retenido la actividad fisiológica, mientras que un gran porcentaje no puede formar colonias en medios de cultivo convencionales. Por lo tanto, los recuentos microbianos por medio de conteos directos son siempre más altos que el conteo de placas estándar. Sin embargo, el análisis de microscopía de epifluorescencia es un procedimiento lento que en el momento no permite la detección rápida de muestras múltiples.

Citometría de Flujo

Varios estudios han demostrado la aplicabilidad del uso de "marcadores de viabilidad y de citometría de flujo para el recuento rápido de los microorganismos en el agua de calidad farmacéutica [29-33]. El marcador de viabilidad más

comúnmente utilizado se basa en la reacción de las bacterias con el tinte ChemChrome B (CB). La preparación de la muestra consiste en el filtrado a través de una membrana de 0.45 micrones seguido por la marcación de la célula y escaneo láser. El tinte, un tipo éster con fluoresceína, se convierte en un producto fluorescente, un derivado de fluoresceína libre, por la actividad de esterasas intracelulares después de haber sido captado por las células microbianas previamente capturados por la filtración de membrana. Las células microbianas con una membrana celular intacta sólo mantienen el derivado de fluoresceína. Las bacterias se enumeran a continuación, utilizando un láser de barrido, que ha demostrado ser sensible a una sola célula en una muestra y demostró que el conteo fue más sensitivo que el método de conteo de heterótrofos de placa. Resultados similares han sido encontrados por tinción fluorescente con la filtración por membrana usando DAPI, otros medios de crecimiento, y citometría de flujo. En otro estudio, muestras de un sistema de intercambio de iones, sistema de ósmosis inversa, y agua purificada fueron analizados y procesados. Los análisis de microscopia de fluorescencia de las muestras de agua utilizando DAPI se han traducido en mayores recuentos microbianos. De los dos medios de cultivo utilizados por la filtración de membrana, R2A ha mostrado un mayor número de células microbianas. Sin embargo, el número de bacterias obtenidas por el instrumento de escaneo láser parece ser más alto que el conteo de placas estándar. Análisis de agua del grifo, agua purificada y agua para inyección (WFI) en varios sitios farmacéuticos también ha demostrado que la citometría de flujo es equivalente al método de filtración por membranas convencionales. Estudios de recuperación en cultivos puros demuestran una buena correlación entre los métodos, con un coeficiente de correlación menor de 0.97 para todos los organismos analizados (bacterias vegetativas, esporas, hongos y levaduras). Sin embargo, ninguno de los estudios informó el procesamiento múltiple de muestras de agua.

Estudios adicionales han sido recientemente realizados en el antibiótico macrólido, espiramicina, mediante citometría de fase sólida [33]. Con el método convencional de la placa heterotrófica en paralelo, la recuperación completa sólo se ha obtenido de los organismos resistentes a espiramicina. Los microorganismos que fueron sensibles a los antibióticos se han mantenido inhibidos o estresados por la acción de la espiramicina y no crecen en las placas de cultivo, pero son detectados por citometría de flujo. Estos resultados indican, además, la insuficiencia de los métodos estándar para recuperar microorganismos estresados o heridos.

El análisis de la carga microbiana de las muestras en cultivos celulares de células mamíferas, también se han llevado a cabo mediante citometría de flujo [34]. En lugar del tiempo de incubación requerido de 7 días para las pruebas estándar de carga biológica, los análisis se completan dentro de 4 horas. El ensayo es lo suficientemente sensible para detectar de 5 a 15 UFC / ml después de 4 horas. La ventaja de un análisis rápido es que los resultados se conocen antes de que un lote es procesado. En algunos casos, la contaminación microbiana ha sido encontrado después de los lotes son procesados dando lugar a enormes pérdidas financieras.

Las pruebas de esterilidad de productos farmacéuticos garantizan la seguridad y la estabilidad de una formulación dada. El producto debe estar libre de contaminación microbiana de lo contrario puede causar daños al paciente. Dos métodos de prueba de esterilidad, la prueba de esterilidad ScanRDI ® rápida y la Farmacopea de los Estados Unidos / Farmacopea Europea / Farmacopea Japonesa (siglas en inglés, USP / EP / JP), se compararon con respecto a los límites de detección de la presencia de microorganismos viables en soluciones acuosas a niveles de inoculación bajo. Ocho microorganismos fueron evaluados. El método ScanRDI ® resultó ser numéricamente superior y estadísticamente no inferior a la prueba de esterilidad compendio (USP / EP / JP) con respecto a los límites de detección para todos los organismos analizados [35].

Impedancia y Producción de Gas

Cuando los microorganismos crecen en medios de enriquecimiento, como resultado del metabolismo microbiano algunos de los sustratos se convierten en productos finales de alta carga [36]. Estos sustratos son generalmente sin carga o carga débil, pero se transforman durante el crecimiento microbiano. Debido a su naturaleza, los productos finales aumentan la conductividad de los medios de cultivo provocando una disminución en la impedancia. La impedancia es la resistencia al flujo de una corriente alterna que pasa por un material conductor.

El tiempo de detección de impedancia (Td) es cuando la resistencia al flujo de una corriente alterna indica el crecimiento de un microorganismo como resultado de cambios en el medio de cultivo. Varios estudios han demostrado la aplicabilidad de la impedancia directa para la detección de la actividad microbiana en productos farmacéuticos. Debido a que la impedancia es una tecnología de crecimiento dependiente, el medio debe ser elegido para permitir el crecimiento de microorganismos y también para ser optimizado para la señal eléctrica.

Sustratos para este tipo de medios de cultivo serán descargados o débilmente cargados, tales como la glucosa que cuando se convierte en ácido láctico aumenta la conductividad de los medios de cultivo. Sin embargo, una modificación actual llamada impedancia indirecta monitorea el metabolismo microbiano mediante la medición de la producción de dióxido de carbono. El dióxido de carbono retirado del medio de crecimiento resulta en una disminución de la conductividad. El uso de la impedancia indirecta permite el uso de los medios de cultivo que no puedan generar una respuesta eléctrica óptima utilizando el método directo.

Una buena correlación entre el tiempo de detección directa de la impedancia (Td) y recuento total de colonias que se ha obtenido en un caso de suspensiones de *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 [36]. Resultados similares se han encontrado con las suspensiones de los microorganismos de ensayo tratados durante períodos variables de contacto con las concentraciones de diferentes agentes antimicrobianos. La única diferencia es que el tiempo de detección de las células tratadas se extiende más que las no tratadas. El ensayo es lo suficientemente sensible para detectar bacterias, levaduras y hongos.

Las Impedancia ha sido comparada con la técnica de epifluorescencia directa (DEFT-MEM) y el ATP de bioluminiscencia para la detección de contaminación microbiana en las células expuestas a diferentes agentes antimicrobianos [37]. Cuando las suspensiones de *S. aureus* ATCC 6538 y *C. albicans* ATCC 10231 tratadas con clorhexidina fueron analizadas se obtuvo una buena respuesta. La aplicación de impedancia para la investigación farmacéutica requiere el desarrollo de las curvas de crecimiento para los diferentes microorganismos estudiados. El sistema no puede procesar múltiples muestras.

Un sistema con un alto rendimiento y capaz de procesar múltiples muestras es el BacT / ALERT (Figura 1). El sistema consta de un módulo con una incubadora estándar de 4 cajones. Un total de 240 muestras pueden ser analizadas simultáneamente. El sistema utiliza un sensor colorimétrico y la luz reflejada para determinar la cantidad de dióxido de carbono (CO_2) que se disuelve en el medio de cultivo. Si los microorganismos están presentes en la muestra, el CO_2 se produce cuando los organismos metabolizan los sustratos en el medio de cultivo. Cuando el crecimiento de los microorganismos produce CO_2, el color del sensor en la parte inferior de cada botella de cultivo cambia y la luz se refleja en el sensor. Esta información se transmite al equipo en el que se compara con el nivel inicial de CO_2 en la botella. La muestra se determina positiva basada en la tasa de producción de CO_2. Si después de un determinado número de días el nivel de CO_2 no cambia de manera significativa, la muestra se determina negativa. Las células se examinan con puntos de datos graficados cada 10 minutos. Los estudios demostraron el uso del sistema para determinar la esterilidad de los productos de terapia celular [38]. La prueba de esterilidad de los condrocitos autólogos cultivados ha sido validada mediante la demostración de la recuperación de todos los microorganismos inoculados. El estudio demostró la viabilidad del sistema para detectar continuamente la contaminación por bacterias, levaduras y hongos.

Figura 1. *Sistema BacT/ALERT*

El sistema BacT / ALERT también fue usado para el análisis de agua estéril de inyección y productos biofarmaceuticos [39]. Diferentes bacterias, levaduras, y hongos fueron detectados de una manera rápida y eficaz. Los tiempos de detección fueron significativamente más bajos que los tiempos requeridos por las diferentes farmacopeas para los análisis de esterilidad. En el estudio se utilizaron bacterias de aislamientos ambientales para comparar estas bacterias con las cepas estándar. Un total de 11 microorganismos fueron inoculados en las

muestras incluyendo aeróbicos y anaeróbicos. El mayor tiempo de detección se encontró con la cepa ambiental *Methylobacterium radiotolerans*. El tiempo de detección en agua estéril de inyección fue 4.31 días mientras que en los productos se necesitó un tiempo mayor de 6.50 días. Comparado con la prueba estándar de esterilidad que tiene un tiempo final de 14 días el sistema BacT / ALERT fue significativamente más rápido y preciso.

Tecnología de PCR

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información genética que controla el desarrollo de una célula microbiana. El ADN determina el potencial genotípico y fenotípico de la célula microbiana. Con los últimos avances en genómica, donde más de 100 genomas microbianos han sido secuenciados, la posibilidad de utilizar la información genética para la detección y discriminación de los microorganismos es interminable. Las tecnologías genéticas pueden aumentar la resolución y la especificidad de la detección e identificación microbiana en ambientes farmacéuticos. Una de las tecnologías basadas en el análisis de ADN es la reacción en cadena de PCR.

La PCR amplifica secuencias específicas de ADN a lo largo del genoma microbiano. Por ejemplo, un conjunto de cebadores de ADN se utilizan para apuntar la secuencia específica que va a ser amplificada (Figura 2).

Figura 2. *Pasos del ensayo de reacción de RCP.*

1) Doble hélice desnaturalizado por calentamiento

2) Los cebadores están alineados a las secuencias complementarias del ADN

3) Cebadores son extendidos por la polimerasa de ADN derivando dos cadenas de ADN

La reacción de PCR se lleva a cabo en 3 etapas diferentes. En primer lugar, el ADN se desnaturaliza por el calor. En segundo lugar, los cebadores se alinean a las secuencias complementarias de las hebras de ADN. En tercer lugar, los cebadores son extendidos por la enzima ADN polimerasa que resulta en dos hebras diferentes. Los tres pasos se repiten de nuevo por un número determinado de ciclos, por ejemplo de 30 a 35. Una vez la secuencia es amplificada, los productos se detectan mediante electroforesis en gel [40,48]. Sin embargo, hay sistemas que se basan en la detección de la fluorescencia de los productos amplificados en tiempo real [49].

En los laboratorios farmacéuticos ensayos basados en PCR han demostrado ser capaz de detectar *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus brasiliensis*, y secuencias eubacteriales después de un período de incubación [40,47]. Esto ha sido posible no solo cuando las muestras están comprometidas con una contaminación de solamente un tipo de bacteria, pero también cuando la contaminación bacteriana es mixta [50,51].

Los analistas, las materias primas, equipos, o el agua introducen algunos de estos microorganismos en ambientes farmacéuticos. Por otra parte, cuando los analistas no siguen las buenas prácticas de laboratorio se convierten en las principales fuentes de contaminación microbiana en cuartos limpios y fabricación aséptica. La detección rápida de los microorganismos objetables resulta en la implementación de las acciones correctas para evitar que la contaminación se repita. Los tiempos de detección con las PCR van desde 24 a 27 horas. Se trata de una reducción significativa en comparación con el tiempo de detección estándar de 5-7 días. Por otra parte, la detección de alto rendimiento de las muestras es posible utilizando un formato de 96 pocillos.

La simplificación de los análisis de PCR para el control de calidad farmacéutica se logra mediante el uso de una tableta y un formato de cuentas. Los reactivos de PCR, incluyendo cebadores, se combinan en forma de tableta, mientras que en las cuentas se proporcionan los reactivos necesarios para la reacción de PCR, pero sin los cebadores de ADN [40-45]. Las preparaciones largas y manejo de reactivos individuales no son necesarios debido a los formatos de tableta y de cuentas. La extracción del ADN microbiano de los medios de enriquecimiento se realiza en solo dos pasos. Para las bacterias y levaduras, una preparación de la muestra en una solución de Tris-EDTA-Tween 20 con proteinasa K a 35 °C resulta en un ADN de alta calidad mientras para las muestras con hongos se tiene que hacer una ebullición de las muestras en una solución de SDS durante 1 hora. Con los últimos avances en la genómica microbiana, la disponibilidad de secuencias de los cebadores de ADN es ilimitada lo cual permite el desarrollo de cebadores universales para las bacterias, levaduras y hongos. Un estudio reciente ha demostrado la aplicabilidad de detectar la contaminación bacteriana de las pruebas de esterilidad mediante un ensayo de PCR [44]. El estudio se basa en el carácter universal y la inclusión de las secuencias de ADN bacteriano que codifica para genes ribosomales. Los cebadores dirigidos a estas secuencias de ADN bacteriano común son capaces de la detección rápida de muestras de contaminación bacteriana. Es posible también la detección simultánea de múltiples secuencias de ADN microbiano en muestras farmacéuticas [46, 47].

La PCR también se ha utilizado para el seguimiento de las muestras de agua en los procesos de fabricación farmacéutica [11]. Secuencias de ADN ribosomal se amplificaron con cebadores universales bacterianos. Después de la amplificación, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (gradiente de desnaturalización de electroforesis en gel (DGEE)) para detectar los productos amplificados. Esto permitirá la separación de los fragmentos de ADN de la misma longitud, pero con diferentes secuencias. Después de la separación, los geles se analizan para generar un perfil densitométrico. La secuenciación de los fragmentos amplificados ha revelado que las bacterias dominantes en las muestras de agua no son cultivables en los medios de cultivo estándar. La mayoría de las especies de bacterias cultivables se han encontrado para ser relacionado con *Bradyrhizobium* spp., *Xanthomonas* spp. y *Stenotrophomonas* spp., mientras que las especies dominantes de bacterias incultivables no se han caracterizado. Estos estudios mostraron la capacidad limitante de los métodos estándar para determinar y caracterizar la estructura de la comunidad microbiana presente en los ambientes farmacéuticos.

Identificación Genética por secuenciación del ADN

Cuando se detecta contaminación microbiana en una muestra farmacéutica, la caracterización de los tipos de microorganismos por géneros y especies es un criterio importante para determinar el origen de la contaminación.

El primer paso en la identificación fenotípica de los microorganismos en los laboratorios farmacéuticos se realiza mediante el método de tinción de Gram. Este método se basa en las diferencias químicas y estructurales entre las membranas y paredes celulares de las bacterias gram positivas y gram negativas. Otras pruebas bioquímicas que se hacen son, por ejemplo, la catalasa y la prueba de oxidasa. En otros casos una suspensión estandarizada del

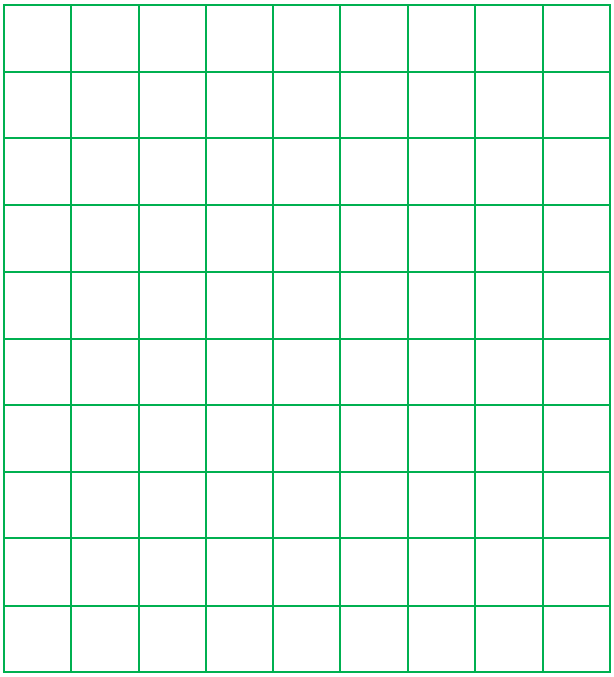
cultivo se inocula en tiras, tarjetas o placas de microtitulación. Estos sistemas se basan en la detección de la actividad enzimática por diferentes tipos de enzimas como oxidasas y los perfiles de utilización de compuestos de carbono. Sin embargo, nuevas pruebas genéticas ofrecen una mayor resolución y discriminación para la identificación microbiana. La Tabla 1 muestra una comparación de la identificación fenotípica y genotípica de especies bacterianas mediante técnicas bioquímicas (fenotípica), lípidos, y los métodos genéticos. El método genético demostró una mayor precisión y reproducibilidad que los lípidos y análisis bioquímicos. Se obtuvieron resultados similares con cepas aisladas de diferentes ambientes farmacéuticos [11, 52]. El análisis de secuenciación de ADN proporciono un mayor nivel de resolución, precisión y determinación que el análisis de lípidos. Varios estudios demostraron que las cepas que no fueron identificadas por análisis fenotípico están correctamente caracterizadas por el análisis de secuencia del ADN ribosomal [11,53,54]. Esto proporciona una información precisa para el seguimiento de la fuente de contaminación en ambientes farmacéuticos y caracterización de la comunidad microbiana que permite acciones correctivas más rápidas y eficaces.

Microarreglos de ADN

La miniaturización de los análisis genéticos, como la PCR y la hibridación de ADN utilizando microarreglos de ADN se ha informado que se utilizaron para determinar la composición microbiana de muestras farmacéuticas y cuartos limpios [54, 55]. Los microarreglos proporcionan una alternativa automática, precisa y de alto rendimiento. El ensayo se divide en cuatro procesos: la preparación de muestras, detección, y el análisis de los resultados [56]. En general, los oligonucleótidos (oligos) sondas son secuencias cortas de ADN o ARN de diferentes tamaños inmovilizado en un soporte sólido como laminillas de vidrio, gel o de silicona. La unión de los oligos al soporte sólido requiere el diseño de matrices de la sonda en las localizaciones predeterminadas. En el ejemplo que se muestra en la Figura 3 se ven las fichas antes de la reacción.

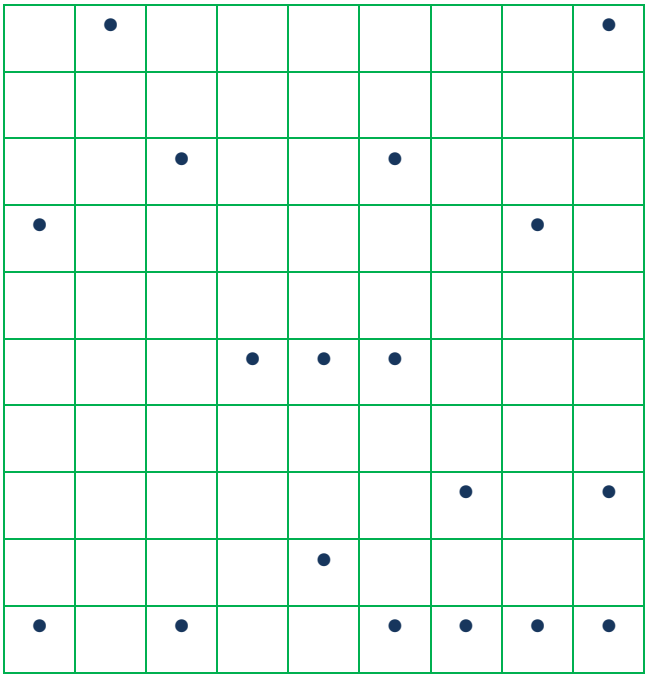
Figura 3. *Microarreglo de las sondas de ADN, antes de la adición de la muestra.*

90 muestras en un microarreglo inmovilizadas en soporte sólido



La Figura 4 muestra que una reacción positiva se indica por el desarrollo de un punto negro en la matriz de microarreglo. Donde hay una reacción positiva, hay un punto negro. Un microarreglo se puede utilizar hasta 30 veces sin deterioro notable de la señal de hibridación. Miles de oligonucleótidos pueden ser inmovilizados en una laminilla, lo que permite la detección simultánea de una gran variedad de microorganismos en una sola muestra.

Figura 4. *Microarreglo de las sondas de ADN, después de la adición de la muestra.*
Oligonucleótidos con secuencias de ADN hibridizado detectó 18 muestras positivas



En comparación con los análisis de PCR, con los microarreglos de ADN se puede detectar la presencia de miles de genes simultáneamente. La primera aplicación de microarreglos de ADN para el control de calidad farmacéutica y de procesamiento fue reportado por Streefalnd et al. [57]. La vacuna contra la tos ferina se basa en el crecimiento de las células de *Bordetella pertussis* en biorreactores. La vacuna es una suspensión de células inactivadas por calor conjunto. La estructura bacteriana que proporciona la mayor parte de la protección inmunológica son las proteínas de la membrana situadas en la membrana externa de la pared celular. Se estudiaron diferentes condiciones de crecimiento las cuales fueron utilizados para optimizar la expresión de estas proteínas. El proceso de cultivo es el más importante paso durante la manufacture de la vacuna, porque la calidad del producto es controlada de una manera precisa. Los genes más importantes para controlar la calidad del producto fueron identificados. Más de 3.000 genes fueron inmovilizados en los microarreglos. Los perfiles de expresión indicaron las condiciones de crecimiento óptimo para maximizar la producción de proteínas. De esta manera fueron capaces de entender cómo las alteraciones ambientales influyen en la fisiología celular y la calidad del producto.

En otro estudio La Duc et al. [54] realizaron un análisis exhaustivo de las bacterias en superficies de cuartos limpios en donde 107 muestras individuales fueron analizadas utilizando la secuenciación de ARN y microarreglos. Sin embargo, a causa de la biomasa microbiana bajo, varias muestras se agruparon para optimizar el proceso. Los microarreglos demostraron una comunidad más diversa en comparación con la secuenciación del ARN. Algunas de las familias de bacterias que se encontraron por ambos métodos eran miembros de la *Flexibacteraceae*, *Oxalobacteraceae* y *Estreptococcaceae*. La clonación y secuenciación de ADN detectaron miembros de la *Ralstoniaceae*, *Pseudomonodaceae* y *Aurantimonadaceae* mientras los microarreglos de ADN detectaron miembros de la *Dictoglomaceae* y familias *Leuconostocaceae*. Ambos métodos fueron capaces de detectar cambios en la composición de la comunidad microbiana basada en diferentes variaciones del medio ambiente. Una gran diversidad de la comunidad microbiana anaeróbica se observó mediante el análisis de microarreglos, incluso después de un riguroso programa de mantenimiento de limpieza de los cuartos limpios.

Inmunoensayos

Aunque los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ampliamente utilizados en análisis clínicos y de alimentos, no fue sino hasta recientemente que estos métodos fueron aplicados al control de calidad farmacéutica. Las pruebas de ELISA se realizan utilizando distintos formatos. El formato más común para el análisis de productos farmacéuticos se basa en la inmovilización de anticuerpos de alta afinidad, específicos para

diferentes tipos de microorganismos, en la superficie de los pocillos. La muestra se aplica luego al pozo y se incuban. Un anticuerpo conjugado a enzima se añade para reaccionar con el microorganismo capturado. Esto dará lugar a la formación de un conjugado de anticuerpo-microorganismos "sándwich". Para desarrollar una señal de la detección, un sustrato químico se añade a reaccionar con la enzima en el conjugado. Si hay un microorganismo en la muestra, una reacción de color se desarrollará. La ausencia microbiana se indica por la ausencia de color. El uso de un formato de placa de microtitulación de 48 a 96 pozos permite la detección de alto rendimiento de las muestras de productos farmacéuticos. Estudios demostraron que la presencia del *S. aureus* fue detectada en 24 horas en muestras de productos farmacéuticos contaminados con cultivos puros y mixtos [58]. Estos resultados indican que los ensayos son lo suficientemente específicos para detectar un solo microorganismo en la presencia de otras especies microbianas. Otros microorganismos como *P. aeruginosa* y S. *typhimurium* también se detectaron rápidamente mediante la prueba ELISA (Tabla 4)

En comparación con el tiempo de detección de 5 días, utilizando los métodos estándar, el método ELISA se encontró más eficaz reduciendo el tiempo de detección y mano de obra. Además, el procesamiento múltiple y análisis de las muestras ha sido posible gracias al formato utilizado. Otro estudio de validación se llevó a cabo para comparar los análisis de ELISA con los métodos estándar [59]. Otros productos probados incluyen una amplia gama de productos farmacéuticos tales como jarabes para la tos, laxantes, tratamientos de úlcera, los preparados para lactantes, crema antiséptica, así como algunos de los ingredientes farmacéuticos. Este estudio confirmo la sensibilidad de ELISA para el análisis de diferentes productos y muestras.

Tabla 4. *La detección de contaminación microbiana utilizando inmunoensayos.*

Producto	Bacteria	Dilución	Tiempo de Detección (días)	
			Método Estándar	ELISA
A	*S. aureus*	1:100	4-5	1
	P. aeruginosa	1:100	4-5	1
	S. typhimurium	1:100	4-5	1
B	*S. aureus*	1:10	4-5	1
	P. aeruginosa	1:10	4-5	1
	S. typhimurium	1:10	4-5	1
C	*S. aureus*	1:10	4-5	1
	P. aeruginosa	1:10	4-5	1
	S. typhimurium	1:10	4-5	1
D	*S. aureus*	1:10	4-5	1
	P. aeruginosa	1:10	4-5	1
	S. typhimurium	1:10	4-5	1
E	*S. aureus*	1:10	4-5	1
	P. aeruginosa	1:10	4-5	1
	S. typhimurium	1:10	4-5	1

Autofluorescencia

El análisis cuantitativo mediante citometría de flujo y bioluminiscencia de ATP resultaron en una rápida enumeración de microorganismos en muestras de productos farmacéuticos. Sin embargo, ambos ensayos son destructivos y no aportan para el análisis de alto rendimiento. Por otra parte, en la cuantificación del ensayo de bioluminiscencia los resultados no son precisos y confiables más allá de los 75 UFC/ 100 ml. La citometría de flujo ofrece una amplia gama de cuantificación. Sin embargo, la filtración a través de una membrana de 0.45 micrones, con 25 milímetros de diámetro puede ser un factor limitante. Si es necesaria la identificación microbiana, el análisis de la muestra debe basarse en el recuento de enriquecimiento de la placa estándar para el aislamiento e identificación de las colonias microbianas necesarias para ser caracterizado.

Un análisis cuantitativo no destructivo de muestras farmacéuticas se puede realizar mediante el sistema de crecimiento directo ™ [60]. El sistema utiliza una imagen de área digital que no ha sido amplificada para la detección del crecimiento de las células microbianas en agua, productos, materias primas, muestras de aire y contacto con

la placa. La prueba utiliza los medios de cultivo estándar de crecimiento y de filtración por membrana. El ensayo no requiere adición de reactivos. Las muestras se aplican a las membranas, se colocan en las placas de cultivo, y entonces se colocan en el instrumento el cual las incuba y toma las imágenes usando un detector con un dispositivo de carga acoplada. Las colonias microbianas se detectan mediante la autofluorescencia intrínseca de las células microbianas. Esta autofluorescencia se origina en las moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina y riboflavina presente en las células microbianas.

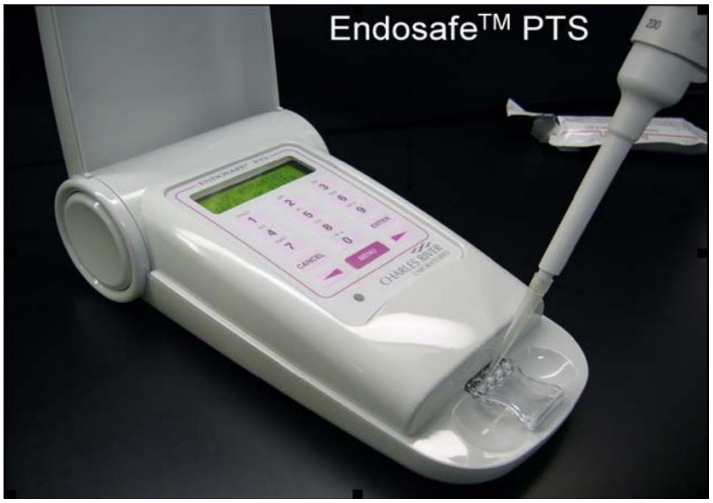
Las muestras ambientales mostraron un ahorro de tiempo de 50-80% para el análisis microbiológico [60]. Además, en comparación con los métodos tradicionales, el crecimiento directo™ permite la enumeración rápida de las células microbianas. Por ejemplo, *E. coli* se enumeró en un plazo de 12 horas usando el método estándar, mientras que el crecimiento directo ™ se completó en 3 o 5 horas. El ahorro de tiempo para la cuantificación de la levadura y el hongo es 80% y 70%, respectivamente. El sistema conserva las ventajas clave de las pruebas tradicionales, ya que no mata los microbios que detecta, las microcolonias podrían seguir dividiendo después de la detección temprana para formar las macrocolonias. Esto facilita la identificación posterior de las colonias aisladas en los medios de cultivo.

Otro sistema que utiliza la autofluorescencia es el BioVigilant IMD-A, el cual es una nueva tecnología de espectroscopia óptica para la detección, clasificación y cuantificación de las partículas viables y no viables en tiempo real. Estudios comparativos con los sistemas convencionales de muestreo de aire se realizaron recientemente [15,61]. Los estudios han demostrado que el IMD BioVigilant-A es capaz de enumerar ambas partículas viables y no viables simultáneamente y de forma instantánea en una variedad de ambientes clasificados y no clasificados. La capacidad de esta tecnología para proporcionar datos en tiempo real puede ofrecer a la industria una ventaja sin precedentes sobre las muestras basadas en el crecimiento en medios de cultivo para el seguimiento del estado del control microbiológico en entornos de fabricación de productos farmacéuticos.

Prueba de endotoxinas

Las bacterias Gram-negativas son la principal causa de contaminación de los productos estériles en los Estados Unidos [22]. Las endotoxinas son importantes componentes estructurales de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Si están presentes en biofarmacéuticos inyectables, pueden desencadenar reacciones que conducen a la morbilidad extrema, es decir, fiebre, o la mortalidad [62]. Algunas de las fuentes potenciales de contaminación por endotoxinas es el agua, excipientes tales como disolventes, agentes espesantes, agentes quelantes, antioxidantes, agentes reductores, los preservativos, y aditivos especiales. El análisis de endotoxinas se realiza por tres tecnologías básicas, que se basan en el altamente sensible Lisado de Amebocito del Limulus (LAL). Estas tecnologías son el coagulo de gel, el análisis de punto final, y los ensayos cinéticos. En el coágulo de gel una muestra cargada en un tubo que contiene un lisado de sensibilidad específica se incuba durante 60 minutos y los resultados son basados en la formación de coágulos sólidos en los tubos [62]. El problema con esta tecnología es que no es ni cuantitativa ni sensible. Estudios recientes han demostrado la validación de un ensayo cromogénico-cinético portátil [62].

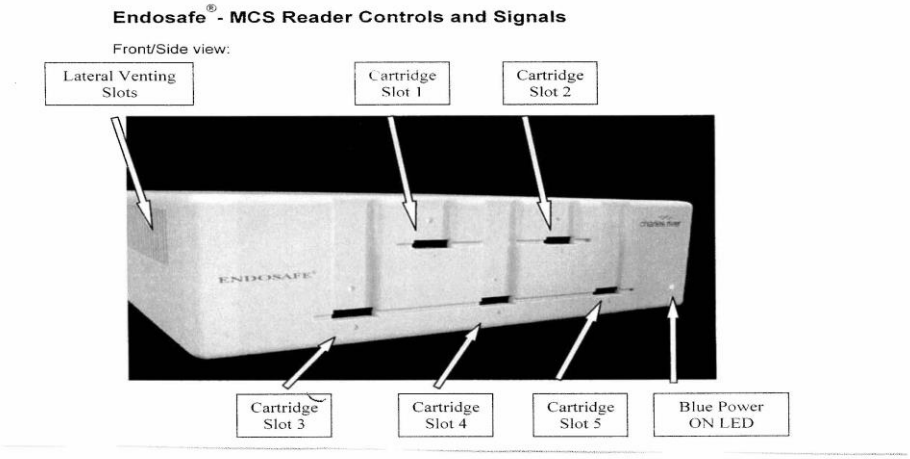
Figura 5. *Sistema Cromogénico Portatil*



El sistema es un ensayo cromogénico-cinéticos basado en la detección de pirógenos midiendo la intensidad del color en relación con las concentraciones de endotoxina presentes en una muestra (Figura 5). Los cartuchos de poliestireno contienen todos los reactivos necesarios para realizar la prueba. El análisis de muestras se realiza en 15 minutos. El ensayo fue capaz de la cuantificación rápida de endotoxinas en agua y muestras de productos biofarmacéuticos. Un producto de terapia celular también fue validado con el sistema, con resultados casi idénticos [63]. Sin embargo, se encontraron algunas sustancias inhibitorias en las muestras que requieren diluciones adicionales para validar los ensayos.

Otro estudio utilizando un sistema de multi cartuchos (MC) logro analizar 5 muestras simultáneamente [64]. Los cartuchos son puestos en cinco diferentes ranuras en las cuales se analizan las cinco muestras simultáneamente (Figura 6). Esto permite un análisis rápido que no solamente optimiza el procedimiento, pero también libera a los analistas de cometer errores durante las calculaciones. El sistema transmite los datos a una computadora la cual determina la cantidad de endotoxina presente en las cinco muestras.

Figura 6. *Sistema de Multi Cartuchos*



Agua estéril de inyección y productos biofarmacéuticos fueron analizados cuantitativamente utilizando el ensayo cromogénico el cual demostró equivalencia entre el método estándar y el cromogénico. Pero sin embargo el método cromogénico (MC) fue más preciso con un nivel de resolución más profundo.

¿Cómo Validar un Método Rápido?

Como se mencionó en la introducción, las agencias reguladoras publicaron varios capítulos sobre la validación de métodos microbiológicos alternativos o rápidos [6,7]. En los capítulos se describen algunos de los parámetros recomendados para demostrar la equivalencia con los métodos estándar o convencionales. Algunos de los parámetros descritos en estos documentos son los siguientes:

- Sensibilidad
- Exactitud
- Especificidad
- Linealidad
- Límite de detección
- Vigor
- Resistencia
- Alcance
- Precisión

Todos estos parámetros son aplicables a las diferentes tecnologías discutidas previamente. Por ejemplo, si se está validando un método cualitativo que indica la presencia de la ausencia de microorganismos, entonces tiene que hacer la precisión, exactitud, límite de detección, vigor y sensibilidad. Estudios adicionales de alcance y linealidad no son necesarios porque no se cuentan el número de microorganismos en la muestra.

El plan de validación debe ser completo y detallado. En primer lugar, se describe el método explicando la tecnología y componentes. A continuación, se procede a desarrollar el protocolo para la instalación, operación y desempeño del sistema. La información proporcionada por el fabricante del sistema es el comienzo de la recogida y verificación de toda la documentación necesaria. En la Tabla 5 se puede ver el protocolo utilizado en el sistema rápido de endotoxina previamente discutido.

Tabla 5. *Protocolo para la Validación de un método rápido para la prueba de endotoxinas.*

Calificación de la Instalación	Calificación de la Operación	Calificación del Rendimiento
• Prueba de Sistema de verificación de documentación • Lista de equipo y componentes • Verificación de la calibración del Instrumento • Verificación de las Utilidades • Verificación de la instalación	• Prueba de Sistema de comprobación automática • Prueba de iniciación de prueba de aceptabilidad • Un cartucho de prueba se ha insertado en el lector antes de que la temperatura alcance 37°C. • Prueba de Aceptabilidad de entrada de Información. • Códigos no válidos de número de lote y de calibración de los cartuchos se entraron en el sistema. • Prueba de la operación batería • Después de que el detector esté apagado y desconectado de la fuente de alimentación, que completa el sistema de auto-test y asciende a 37°C utilizando la energía de la batería después de que se vuelva a encenderla.	• Prueba de funcionamiento interno de la bomba. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba Cinética del Ruido. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba de Verificación y Calibración del método. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba de Verificación de Resultados de Endotoxinas. • Las muestras de 25 microlitros de una solución de 0.1 UE / ml de endotoxinas. Se añaden a 4 pozos en el cartucho de prueba. • Comparación del método convencional con el método rápido.

Básicamente, la calificación de la instalación es demostrar que el instrumento o sistema ha sido instalado de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante. La calificación de la operación es demostrar que el equipo instalado opera basado en los límites predeterminados cuando se utiliza según los procedimientos establecidos durante la validación. Por último, la calificación de desempeño demuestra que el instrumento lleva a cabo los análisis según los criterios establecidos y que los resultados obtenidos son correctos y reproducibles. Al final las muestras son examinadas con el método rápido y el método estándar para demostrar la equivalencia. El método alternativo debe ser tan bueno o mejor que el método estándar. Por ejemplo, el método alternativo para la prueba de endotoxinas ha demostrado ser más sensible, preciso y más rápido que el método estándar [58,59].

Conclusión

Sobre la base de estudios publicados en revistas científicas, hay varias nuevas tecnologías disponibles que pueden sustituir o complementar los métodos microbiológicos convencionales para las pruebas de control de calidad de las muestras de productos farmacéuticos. Los métodos rápidos han demostrado ser eficaces, fiables, sensibles, y equivalentes a los ensayos microbiológicos regulares. Por otra parte, debido a la reciente demostración de bacterias incultivables en ambientes farmacéuticos y los diferentes tipos de respuestas fisiológicas a las fluctuaciones ambientales, los métodos rápidos proporcionan una descripción más completa de la comunidad microbiana presente en los productos, el medio ambiente, personal y materias primas. Dado que la contaminación

microbiana es un evento esporádico en los ambientes farmacéuticos, el análisis rápido de los lotes proporciona una rápida liberación de aproximadamente el 99% de las muestras analizadas. Cuando la contaminación microbiana se encuentra, los métodos específicos rápidos, como el inmunoanálisis o la tecnología de PCR puedes analizar las muestras para detectar la presencia de microorganismos patógenos objetables con alta capacidad de procesamiento. Sin embargo, los sistemas cuantitativos a la fecha no tienen una alta capacidad de rendimiento de procesamiento.

Como se ha demostrado por los estudios científicos publicados, la validación que muestra la equivalencia entre los métodos convencionales y rápidos se debe realizar antes de la aplicación. Algunas de las tecnologías son más precisas que los métodos microbiológicos convencionales. Por ejemplo, la enumeración y detección de bacterias que no crecen en los medios de cultivo estándar crean una situación donde se requiere cambios en las especificaciones. Sin embargo, los cambios en las especificaciones se pueden documentar si hay una ventaja significativa en el uso del método alternativo. Varios términos, tales como la viabilidad microbiana, se redefine como por los datos concretos en apoyo de los cambios que indican que un microorganismo puede ser viable, pero no es capaz de crecer en medio de enriquecimiento convencionales. Por ejemplo, en los estudios de citometría de flujo, conteo directo, y de PCR varias especies microbianas se han encontrado ser miembros predominantes de la comunidad microbiana, pero no han sido aislados o detectados utilizando los métodos estándar. Sin embargo, esto no debe desalentar el uso de estas tecnologías, sino por el contrario crear un entorno en el que su uso va a desarrollar la información adicional que puede ser utilizada para mejorar significativamente los procesos de control microbiológico. En el siglo XXI, con los avances en ciencias de la computación, la automatización, la química combinatoria, la genómica y la medicina, la microbiología de control de calidad requiere menor tiempo de rotación, mayor resolución y sensibilidad sin comprometer la eficacia. Estas nuevas tecnologías mejoran la capacidad de un sistema de control de calidad para la evaluación de riesgos y control de procesos. Entre otras características, un sistema ideal de microbiología rápida estará integrado por un alto rendimiento, identificación rápida, facilidad de uso, alta capacidad de procesamiento. Sin embargo, en un futuro no muy lejano el laboratorio de microbiología de control de calidad puede tener un instrumento para análisis de agua y otros para el recuento microbiano, la vigilancia ambiental, pruebas de esterilidad, y la identificación microbiana. Los métodos rápidos pueden complementar o sustituir los ensayos microbiológicos estándar para proporcionar una mayor resolución y análisis de las comunidades microbianas presentes en los ambientes farmacéuticos resultando en el mejoramiento de la vigilancia en contra de la contaminación microbiana.

Referencias:

1. United States Pharmacopeia. Chapter 71. *Sterility test*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 65-70, (2011).

2. United States Pharmacopeia. Chapter 61. *Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 52-56, (2011).

3. United States Pharmacopeia. Chapter 61. *Microbiological examination of nonsterile products: test for specified microorganisms*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 56-61, (2009).

4. United States Pharmacopeia. Chapter 1116. *Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 633-641, (2011).

5. European Pharmacopeia. Chapter 2.6.1. *Sterility*, European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 155-158, (2009).

6. United States Pharmacopeia. Chapter 1223. *Validation of alternative microbiological methods*. U.S. Pharmacopeial Convention: Rockville, Maryland, 731-733, (2009).

7. European Pharmacopeia. Chapter 5.1.6. *Alternative methods for control of microbiological quality*. European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 532-543, (2009).

8. PDA Technical Report Number 33. *Evaluation, validation, and implementation of new microbiological testing methods*. J. Parent Sci. Tech. 54, (2000).

9. Casey, W., Muth, H., Kirby, J., and Allen, P. *Use of nonselective preenrichment media for the recovery of enteric bacteria from pharmaceutical products.* Pharm. Technol. 22: 114-117, (1998).

10. Palmieri, M.J., Carito, S.L., and Meyer, J. *Comparison of rapid NFT and API 20E with conventional methods for identification of gram-negative nonfermentative bacilli from pharmaceutical and cosmetics*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2838-3241, (1998).

11. Kawai, M., Matsutera, E., Kanda H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. *16S Ribosomal DNA-Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.* Applied and Environmental Microbiology 68: 699-704, (2002).

12. Nagarkar P., Ravetkar, S.D., and Watve, M.G. *Oligophilic Bacteria as Tools To Monitor Aseptic Pharmaceutical Production Units. Applied and Environmental Microbiology.* 67: 1371-1374, (2001).

13. Kawai, M., Yamaguchi, N., and Nasu, N. *Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process*. J. Appl. Microbiol.; 86: 496-504, (1999).

14. Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T., and Kern, R. *ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean room facilities*. J. Microbiol. Methods; 52:367-377, (2003).

15. Miller M.J., Walsh, M.R., Shrake, J.L., Dukes, R.E., Hill, D.B. *Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part II. Case studies in environmental monitoring during aseptic filling, intervention assessments, and glove integrity testing in manufacturing isolators*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 63, 259-83, (2009).

16. Cundell, A.M. *Review of the media selection and incubation conditions for the compendial sterility and microbial limit tests*. Pharmacopeial Forum 28: 2034-2041, (2002).

17. Underwood, E. *Ecology of microorganisms as its affects the pharmaceutical industry*. In W.B. Hugo and A.B. Russell eds. Pharmaceutical Microbiology, 6th Edition, Blackwell Science, Oxford, England, 339-354 (1998).

18. Roszak, D.B., and Colwell, R.R. *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiol. Rev. 51:365-379, (1987).

19. Sundaram, S., Mallick, S., Eisenhuth, J., Howard, G., and Brandwein, H. *Retention of water-borne bacteria by membrane filters. Part II: Scanning electron microscopy (SEM) and fatty acid methyl ester (FAME) characterization of bacterial species recovered downstream of 0.2/0.22 micron rated filters*. PDA J Pharm Sci Technol 55:87-113, (2001).

20. Papapetropoulou, M., and Papageorgakopoulou, N. *Metabolic and structural changes in Pseudomonas aeruginosa, Achromobacter CDC, and Agrobacterium radiobacter cells injured in parenteral fluids*. PDA J. Pharma. Sci. Technol. 48:299-303, (1994).

21. Whyte, W., Niven, L., and Bell, N.D. *Microbial growth in small-volume pharmaceuticals*. J. Parenteral Sci. Technol. 43: 208-212, (1989).

22. Jimenez, L. *Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 61, 383-399, (2007).

23. Scalici, C., Smalls, S., Blumberg, S., English, D., and Jimenez, L. *Comparison of Millipore Digital Total Count System and standard membrane filtration procedure to enumerate microorganisms in water samples from cosmetic/pharmaceutical environments*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 199-209, (1998).

24. Marino G., Maier, C., and Cundell, A.M. *A comparison of the MicroCount Digital System to plate count and membrane filtration methods for the enumeration of microorganisms in water for pharmaceutical purposes*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 54: 172-192, (200).

25. Ignar, R., English, D., and Jimenez, L. *Rapid detection of microbial contamination in Triclosan and High Fluoride dentifrices using an ATP bioluminescence assay*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 6: 51-58, (1998).

26. Jimenez, L. *Adenosine Triphosphate bioluminescence analysis for rapid screening of microbial contamination in non-sterile pharmaceutical samples.* PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 58:159-168, (2004).

27. Gray, J.C., Morandell D., Gapp, G., Le Goff, N., Neuhaus, G., Staerk, A. *Identification of microorganisms after Milliflex rapid detection-A possibility to identify nonsterile findings in the Milliflex rapid sterility test.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 65, 42-54, (2011).

28. Gray, J.C., Staerk, A., Berchtold, M., Hecker, W., Neuhaus, G., Wirth, A. *Growth-promoting properties of different solid nutrient media evaluated with stressed and unstressed microorganisms: prestudy for the validation of a rapid sterility test*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 64, 249-263, (2010).

29. Reynolds, D.T., and Fricker, C.R. *Application of lasers scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples*. J. Appl. Microbiol. 86: 785-796, (1999).

30. Wallner, G., Tillmann, D., and Haberer, K. *Evaluation of the ChemScan system for rapid microbiological analysis of pharmaceutical water*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 53: 70-74, (1999).

31. Gapp G, Guoymard, S., Nabet, P., and Scouvart, J. *Evaluation of the applications of a system for real-time microbial analysis of pharmaceutical water systems*. European Journal of Parenteral Sciences 4: 131-136, (1999).

32. Costanzo, S.P., Borazjani, R.N., and McCormick, P.J. *Validation of the Scan RDI for routine microbiological analysis of process water.* PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56: 206-219, (2002).

33. Ramond B, Rolland, X., Planchez, C., Cornet, P., Antoni, C., and Drocourt, J.L. *Enumeration of total viable microorganisms in an antibiotic raw material using ChemScan solid phase cytometer*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 54: 320-331, (2000).

34. Onadipe, A., and Ulvedal, K. *A method for the rapid detection of microbial contaminants in animal cell culture processes.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 55:337-345, (2001).

35. Smith, R., Von Tress, M., Tubb, C., Vanhaecke, E. *Evaluation of the ScanRDI as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method: comparison of the limits of detection*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 64, 356-363, (2010).

36. Connolly, P., Bloomfield, S.F., and Denyer, S.P. *The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics*. J. Appl. Bacteriol. 76: 68-74, (1994).

37. Connolly, P., Bloomfield, S.F., and Denyer, S.P. *A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics*. J. Appl. Bacteriol. 75: 456-462, (1993).

38. Kielpinski, G., Prinzi, S., Duguid, J., Du Moulin, G. *Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release for Carticel, autologous cultured chondrocytes*. Cytotherapy 7, 531-541, (2005).

39. Jimenez, L., N. Rana, J. Amaraj, K. Walker, and K. Travers. 2012. *Validation of the BacT/ALERT® 3D System for Rapid Sterility Testing of Biopharmaceutical Samples*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 66:38-54.

40. Jimenez, L., Smalls, S., and Ignar, R. *Use of PCR analysis for rapid detection of low levels of bacterial and mold contamination in pharmaceutical samples*. Journal of Microbiological Methods 41: 259-265, (2000).

41. Jimenez, L. *Molecular applications to pharmaceutical processes and clean room environments*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 65:242-253, (2011).

42. Jimenez, L., and Smalls, S. *Molecular detection of Burkholderia cepacia in toiletries, cosmetic and pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of AOAC International 83: 963-966, (2000).

43. Jimenez, L., Bosko, Y., Smalls, S., Ignar, R., and English, D. *Molecular detection of Aspergillus niger contamination in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 49-56, (1999).

44. Jimenez, L., Ignar, R., D'Aiello, R., and Grech, P. *Use of PCR analysis for sterility testing in pharmaceutical environments*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 8: 11-20, (2000).

45. Jimenez, L., Smalls, S., Scalici, C., Bosko, Y., and Ignar, R. *PCR detection of Salmonella typhimurium in pharmaceutical raw materials and products contaminated with a mixed bacterial culture using the BAX™ system*. PDA Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology 55: 286-289, (2001).

46. Karanam V.R., Reddy, H.P., Subba Raju, B.V., Rao, J.C., Kavikishore, P.B., Vijayalakshmi, M. *Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1007-1018, (2008).

47. Farajnia, S., Hassan, M., Hallaj Nezhadi, S., Mohammednejad, L., Milani, M., Lotfipour, F. *Determination of indicator bacteria in pharmaceutical samples by multiplex PCR*. J. Rapid Methods in Automation in Microbiology 17, 328-338, (2009).

48. Ragheb, S.M., Yassin, A.S., Amin, M.A. *The Application of uniplex, duplex, and multiplex PCR for the absence of specified microorganism testing of pharmaceutical excipients and drug products*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 66, 307-317, (2012).

49. Skof, A., Poljak, M., Krbavcic. *Real-time polymerase chain reaction for detection of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in pharmaceutical products for topical use*. Journal of Rapid Methods and Automomation in Microbiology 12, 169-183, (2004).

50. Attia, M.A., Ali, A.E., Essam, T.E., Amin, M.A. *Direct detection of Burkholderia cepacia in susceptible pharmaceutical products using semi-nested PCR*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 70, 99-108, (2016).

51. Jimenez, L., Kulko, E., Barron, E., Flannery, T. *Burkholderia cepacia: A problem that does not go away*. EC Microbiology 1.4:203-208, (2015).

52. La Duc, M.T., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K. *Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments.* Appl. Enviro. Microbiol. 73, 2600-2611, (2007).

53. Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., and Raoult, D. *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J. Clin. Microbiol. 38:3623-3630, (2000).

54. La Duc, M.T., Osman, S., Vaishampayan, P., Piceno, I., Andersen, G., Venkateswaran, K. *Comprehensive census of bacteria in clean rooms by using DNA microarray and cloning methods*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6559-6567, (2009).

55. Probst, A., Vaishampayan, P., Osman, S., Moissl, C, Andersen, G., Venkateswaran, K. *Diversity of anaerobic microbes in spacecraft assembly clean rooms.* Appl. Environ. Microbiol. 76, 2837-2845, (2010).

56. Eggers, M., and Ehrlich, D. *A review of microfabricated devices for gene-based diagnostics*. Hematologic Pathology 1995; 9:1-15.

57. Streefalnd, M., van de Waterbeemd, B., Happe, H., van der Pol, L.A., Beuvery, E.C., Tramper, J., Martens, D.E. *PAT for vaccines: The first stage of PAT implementation for development of a well-defined whole-cell vaccine against whooping cough disease*. Vaccine 25, 2994-3000, (2007).

58. English, D., Scalici, C., Hamilton, J., and Jimenez, L. *Evaluation of the TECRA™ visual immunoassay for detecting Staphylococcus aureus in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 193-203, (1999).

59. Hughes, D., Dailianis, A., and Hill, L. *An immunoassay method for rapid detection of Staphylococcus aureus in cosmetics, pharmaceutical products, and raw materials*. Journal of AOAC International 82: 1171-1174, (1999).

60. London, R., J. Schwedock, A. Sage, H. Valley, J. Meadows, M. Waddington, D. Straus. *An Automated System for Rapid Non-Destructive Enumeration of Growing Microbes*. Plos One 5:1-16, (2010).

61. Miller M.J., Lindsay, H., Valverde-Ventura, R., O'Conner, M.J. *Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part I. Review of the technology and comparative studies with conventional methods*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 63, 245-58, (2009).

62. Jimenez, L., Rana, N., Travers, K., Tolomanoska, V., Walker, K. *Evaluation of the Endosafe® Portable testing system™ for the rapid analysis of biopharmaceutical samples*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 64, 211-221, (2010).

63. Gee, A.P., Sumstad, D., Stanson, J., Watson, P., Proctor, J., Kadidlo, D., Koch, E., Sprague, J., Wood, D., Styers, D., McKenna, D., Gallelli, J., Griffin, D., Read, E.J., Parish, B., Lindblad, R. *A multicenter comparison study between the Endosafe® PTS™ rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products.* Cytotherapy. 10,427-35, (2008).

64. Jimenez, L., N. Rana, K. Travers, O. Santiago, J. Amalraj, and K. Walker. 2012. *Rapid quantitative endotoxin analysis of biopharmaceutical samples using a multi-cartridge system.* American Pharmaceutical Review 15, July/August:45-63.

Capítulo V.9.

Validación e implementación de métodos alternativos

Walter Mazzini

Ves cosas y dices, "¿Por qué?"
Pero yo sueño cosas que nunca fueron y digo, "¿Por qué no?".
George Bernard Shaw

Introducción

Elección del método alternativo

Análisis de retorno de la inversión

Requerimientos Específicos del Usuario

Aspectos estratégicos a la hora de validar un método alternativo

Abandonando las UFC, cambio de paradigma

Legislación para la validación de métodos alternativos

United State Pharmacopeia <1223>

Introducción

URS (User Requirements Specifications)

Equivalencia

Parenteral Drug Administration Technical Report #33

Validación del Equipo, del Software y del método.

Establecer criterios de Validación

Consideraciones adicionales

Guía para cambiar criterios de aceptación

European Pharmacopeia 5.1.6

Requerimientos generales de validación

Requerimientos específicos de una validación

Validación de un método microbiológico alternativo:

Ejemplo de la validación de un método alternativo

Métodos de identificación microbiana

Conclusiones

Bibliografía

INTRODUCCION

Desde sus comienzos, a fines del siglo XIX, las técnicas microbiológicas no han evolucionado tanto como otras disciplinas, siendo todavía éstas muy artesanales, dependientes del operador y debido a los prolongados tiempos de incubación, la obtención de un resultado puede tomar varios días.

Es por ello que en control de calidad de la industria farmacéutica, los resultados microbiológicos son el cuello de botella a la hora de liberar un producto, impactando económicamente en los intereses de la compañía, sobre todo cuando se trata de productos estériles donde el ensayo de esterilidad debe cumplir al menos 14 días de incubación, por lo que los gastos de cuarentena en depósito y la falta de stock en el mercado son hechos preponderantes a la hora de presentar un método alternativo en la compañía.

No podemos dejar de pensar que, a pesar de los beneficios económicos, las razones por las cuales optamos por la utilización de métodos alternativos son la mejora en la trazabilidad, la reproducibilidad, la detección y la posibilidad de automatizar el laboratorio de microbiología, y de esta manera asegurar la calidad y la confianza en nuestros resultados. Es por eso que en este capítulo hablamos de métodos alternativos y no de métodos rápidos, porque no todos tienen una reducción notable del tiempo de análisis, pero sí una mejora sustancial con respecto a los aspectos anteriormente mencionados.

Lentamente estos métodos alternativos están tomando lugar en el laboratorio de microbiología, en un principio como complemento en el control de procesos y graneles, y en la actualidad en el análisis de materias primas y productos terminados. Esta lenta implementación se debe a las precauciones tomadas por las autoridades regulatorias a la hora de aprobar estas nuevas tecnologías. Son lógicas estas precauciones ya que estamos ante un cambio de paradigma y hasta hace poco no había mucha evidencia de la equivalencia de estos métodos alternativos con respecto a los métodos tradicionales. El temor más relevante es obtener resultados falsos negativos, que atenten contra la integridad tanto del producto como del paciente. Es así como el concepto de equivalencia va a ser sustancial a lo hora de realizar la validación de un método alternativo.

Elección del método alternativo

En la Sección 5 Capítulo V.8 de este manual “Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos” se detallan los métodos alternativos que existen en el mercado y sus fundamentos. Es menester analizar uno por uno y realizar una preselección para luego contactarse con el fabricante o distribuidor para poder interiorizarse mediante reuniones de:

- Precio del equipo
- Precio de reactivos y consumibles
- Reactivos marca dependientes
- Rendimiento de los reactivos
- Compatibilidad de nuestras matrices con la tecnología
- Requerimientos para la instalación del equipo
- Disponibilidad de servicio técnico
- Disponibilidad de reactivos y consumibles
- Mantenimiento
- Capacitación
- Estudios de Validación de la metodología realizados por el proveedor
- Otros laboratorios que estén usando el equipo
- Algún país que haya autorizado la utilización del equipo para liberar producto

Una vez obtenida esta información tenemos que realizar una comparación punto a punto entre los posibles métodos alternativos considerando las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Es a partir de este estudio comparativo que llegamos a elegir el método alternativo adecuado para las necesidades de nuestro laboratorio.

En este momento estamos preparados para presentar el proyecto en nuestra empresa. Para realizar esta presentación necesitamos hacer un estudio de ROI.

Análisis de Retorno de la Inversión (ROI)

Esta es una de las herramientas más importantes a la hora de presentar un método alternativo a las autoridades de la compañía, ya que en general no son equipos muy económicos. Este análisis compara los costos de la metodología tradicional con respecto a la alternativa. Para el cálculo de los mismos debemos tener en cuenta los siguientes aspectos:

Costos asociados al método tradicional

- Reactivos, medios de cultivo
- Horas analista requeridas para ingreso de muestra, procesamiento.
- Horas analista para la preparación de medios de cultivo
- Horas analista para la interpretación y registro de resultados

También podríamos calcular el costo asociado a la realización de la aptitud de método, qué si bien es por única vez, podemos tener en cuenta para compararlo con el de validación del método alternativo.

Costos asociados al método alternativo

En este punto debemos considerar tres etapas

1) Compra del equipo, instalación y calificación
2) Validación del método alternativo
3) Rutina

De los puntos 1) y 2) se desprende un valor extraordinario que hay que tener en cuenta para el cálculo del Payback Period y así poder calcular en cuánto tiempo podemos recuperar esta inversión inicial.

Para el cálculo del costo de la validación del método alternativo tenemos que tener en cuenta todos los ensayos diagramados para realizar en el plan de validación que presentemos ante la autoridad regulatoria para los cuales tendremos que calcular el costo de:

- Reactivos e insumos
- Mantenimiento del equipamiento
- Capacitación
- Horas analistas operativas

Si bien es por única vez, es muy importante tener en cuenta la dimensión en cuanto a esfuerzo, tiempo y dinero que tiene la etapa de validación. Hay que contemplar y consensuar de antemano con las autoridades de la compañía los mismos. En cuanto a los costos de la validación debemos negociar con la empresa proveedora el precio de los reactivos, ya que en general se suele acordar un descuento aplicable solo para esta etapa.

Luego vamos a tener que calcular los costos asociados a la rutina, en donde ahí si vamos a poder comparar el método tradicional con el alternativo.

Costo del método alternativo en rutina:

- Reactivos e insumos
- Mantenimiento del equipamiento
- Horas analistas operativas

Para el caso del método alternativo tenemos que calcular el dinero que se ahorra por su utilización.

Costos ahorrados por método alternativo

- La disminución de tiempo en la liberación del producto
- Reduciendo el tiempo de cuarentena en depósito
- Solucionar situaciones de falta de stock
- Mejorar los tiempos de solución de eventos durante la producción
- Disminución horas analista
- Disminución de preparación, control y uso de medios de cultivo

Requerimientos Específicos del Usuario

Este documento debe ser redactado por el usuario ya que los requerimientos son dependientes del usuario y del método alternativo elegido. En este documento van a incluirse todas las funciones críticas de la tecnología, los requerimientos de interfaz del usuario, el espacio requerido, condiciones ambientales, requerimientos operacionales. Debe constar la calificación del equipo y la validación de la metodología

ASPECTOS ESTRATÉGICOS A LA HORA DE IMPLEMENTAR UN MÉTODO ALTERNATIVO

La implementación de un método alternativo siempre surge a partir de una necesidad de cambio en:

- Mejorar la trazabilidad
- Mejorar los tiempos de liberación
- Mejorar la calidad de nuestros resultados
- Mejorar la confianza en nuestros resultados
- Encaminar a nuestro laboratorio hacia un nuevo paradigma de tendencia mundial

Es así como los principales impulsores de la utilización de estas metodologías en general van a ser los proveedores y los usuarios.

A la hora de implementar un método alternativo existen varios actores que entran en juego (Figura 1)

Figura 1

Estos actores van a jugar un rol distinto según el momento, existiendo dos coyunturas posibles con respecto a los métodos alternativos. La coyuntura "fundadora" y la coyuntura "afianzada". Esta última se da dentro de un marco donde ya existe un precedente en el país de un método alternativo aprobado por la autoridad regulatoria y donde ya se establecen, si bien va a depender de cada método y cada laboratorio, las bases y formas para la validación y posterior implementación de un método alternativo.

Coyuntura "Fundadora"

Es el escenario planteado previo a la aceptación de un método alternativo por las autoridades regulatorias. Es decir, es aquella situación donde usuarios junto con proveedores impulsan, por diferentes motivos, la aprobación por parte de las autoridades regulatorias, de estos métodos para los que hasta ese momento no había antecedente en el país. Los usuarios van en busca de mejorar la calidad de sus resultados y la eficiencia de los mismos, los

proveedores buscan introducir en el mercado estos equipos que no son económicos y que además se aseguran la venta de reactivos, ya que en su mayoría estos equipos utilizan reactivos "marca dependiente".

Es así como usuario y proveedor deben articularse para lograr un fin común que es la implementación de un método alternativo. Para lograr este objetivo en esta coyuntura, es fundamental lograr la aprobación de la autoridad regulatoria, tarea difícil porque debemos demostrar fehacientemente que el método alternativo es equivalente o superior al método tradicional.

Por otra parte el usuario debe convencer a la compañía de los beneficios que conlleva la implementación de un método alternativo. Como en todo proyecto a largo plazo debemos tener la fuerte convicción de que implementar un método alternativo es en sí un gran paso en este largo camino que es el aseguramiento de la calidad de nuestros resultados. Esta fuerte convicción nos va a sostener en aquellos momentos, que no son pocos, en los que el proyecto parece sucumbir. Son metodologías costosas y debemos saber cómo, cuándo, y a quién presentar el proyecto en la compañía.

Todo empieza por la inquietud, la búsqueda y el estudio profundo de todas las metodologías existentes para poder elegir la que mejor se adapta a nuestro laboratorio. No todos los métodos son convenientes, tenemos que considerar por ejemplo, el volumen de muestras que analizamos, que tipo de matrices tenemos, si son productos filtrables, etc.

Debemos hacer un informe detallado de nuestro proceso de búsqueda y elección, dejando sentado las ventajas y desventajas de cada método analizado. Dentro de este análisis se encuentra el denominado ROI (*return-of-inversion*) retorno de la inversión.

Abandonando las UFC, cambio de paradigma

En su libro "*La estructura de las revoluciones científicas"* (1962)[1], Thomas Kuhn explica que un cambio de paradigma es un cambio en los supuestos básicos dentro de la teoría dominante.

Una revolución científica se produce cuando los científicos encuentran anomalías que no pueden ser explicadas por el paradigma universalmente aceptado dentro del cual ha progresado la ciencia hasta ese momento. Hay anomalías que se descartan como niveles de error aceptables. Cuando suficientes anomalías se han acumulado, el paradigma cae en un estado de crisis. Se forma un nuevo paradigma que obtiene propios adeptos, y acontece una batalla intelectual entre los adeptos del nuevo y aquellos adeptos al viejo paradigma. Cuando un paradigma científico se sustituye por uno nuevo, el nuevo es siempre mejor, no solo diferente.

El lenguaje y las teorías de los diferentes paradigmas no se pueden traducir de uno a otro, no pueden ser evaluados racionalmente entre sí; es decir, que son inconmensurables. Es así como nos encontramos ante la imposibilidad de comparar Unidades Formadoras de Colonias con una señal proveniente de un instrumento. ¿Cómo obtener una conclusión acertada si nuestro patrón en muchos casos es menos exacto, preciso y sensible que el método a evaluar?. Es muy probable que incursionemos en el error de concluir por ejemplo que un método alternativo tiene una alta tasa de falsos positivos, y no que es más sensible que el método tradicional. Es así como la existencia de microorganismos viables, pero no cultivables (VPNC) que pueden detectarse por citometría de flujo y no por las metodologías de recuento tradicionales hace que obtengamos recuentos significativamente distintos, un caso claro se da en la recuperación de microorganismos de muestras de sistemas de aguas. Y si con el método alternativo obtengo mayores recuentos, ¿van a cumplir con los límites establecidos para los métodos tradicionales? ¿hay que crear una equivalencia entre ambos métodos? ¿cómo expreso el resultado si mi equipo brinda eventos fluorescentes por ejemplo?¿tengo que redefinir mis límites de aceptación? Son todos interrogantes que surgen a partir del advenimiento de los métodos rápidos.

LEGISLACION PARA LA VALIDACION DE METODOS ALTERNATIVOS

Una vez realizada la elección del método alternativo tenemos que buscar información acerca de cómo armar un protocolo de validación. Para esto tenemos bibliografía en las farmacopeas, artículos, *papers*, foros, congresos, etc. Todo suma a la hora de formar el criterio que va a avalar nuestro protocolo de validación ya que no existe un protocolo general, sino que cada laboratorio debe desarrollar el suyo en función de su estructura, dinámica y tipos de productos. Este protocolo es el que se va a presentar ante la autoridad regulatoria y puede estar sujeto a modificaciones. Dentro de todas las bibliografías existentes se destacan:

- United States Pharmacopeia chapter <1223>[2]
- European Pharmacopeia chapter 5.1.6[3]
- PDA Technical Report #33[4]

La norma ISO 16140 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs —Protocol for the validation of alternative methods"*, si bien esta norma aplica para alimentos, puede ser útil a la hora de diseñar el protocolo de validación.

USP <1223>

Introducción

Métodos cualitativos: son ensayos que tratan de demostrar la presencia o ausencia de microorganismos en una muestra.

Métodos cuantitativos: son métodos que brindan un resultado numérico (enumeran) del contenido microbiano de una muestra.

La no presencia de microorganismos no significa que en términos absolutos que cero células están presentes en el artículo compendiado. El resultado de "no crecimiento" debe ser interpretado como "no se detectó crecimiento en la muestra testeada del producto compendiado bajo las condiciones especificadas.

Muchas variables pueden afectar el crecimiento de microorganismos presentes en una muestra:

- Selección del medio de cultivo
- Condiciones de incubación
- Requerimientos nutricionales de los microorganismos
- Condiciones fisiológicas de microorganismos
- Características de los productos compendiados

La presencia de una mayor cantidad de microorganismos en métodos alternativos con una señal distinta a la de la UFC no se correlaciona con un mayor riesgo de que un microorganismo objetable esté presente.

No es necesario que el método alternativo y el convencional produzcan resultados similares, lo que es importante es que el método candidato permita que el microbiólogo pueda tomar una decisión equivalente acerca de la calidad del producto.

Hay que considerar por un lado la variabilidad analítica inherente de los métodos microbiológicos y por otro que el crecimiento de los microorganismos sigue una función exponencial, por lo que es razonable considerar que el nivel de precisión típico está en el orden del 15-35% de desvío estándar relativo.

Los métodos alternativos validados por el usuario no sirven como un remplazo legal de los métodos compendiados, que siguen siendo considerados como test de referencia en caso de una disputa. Comprender las fortalezas y las debilidades de las ufc como señal es vital para la validación de un método alternativo que emplee una señal alternativa. Por lo tanto, las ufc no pueden considerarse como la unidad de recuento microbiológico.

Capítulos adicionales en la USP son:

- <1225> Validation of Compendial Procedures
- <1227> Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles[5]
- <1034> Analysis of Biological Assay
- 21 CFR Part 211.194
- ICH Q2R1 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology

En general los microorganismos que se encuentran en los productos compendiados están en condiciones metabólicas limitadas debido por ejemplo a: una baja actividad de agua, un entorno libre de nutrientes, alta fuerza iónica, pH extremo, o en presencias de sustancias químicas antimicrobianas que los estresan severamente y hacen que sea muy difícil recuperarlos.

URS (User Requirements Specifications)

Son los requerimientos técnicos que necesitamos de un método alternativo para poder elegir un equipo y tecnología adecuada. Y debe incluir

- Requerimientos de interfaz
- Requerimientos del espacio
- Requerimientos del ambiente
- Requerimientos operacionales
- Propósito e intención de uso. Plantear la necesidad de uso
- Describir quién va a utilizar el equipo
- Requerimientos operacionales
- Restricciones
- Ciclo de vida: desarrollo, testeo, entrega, validación, entrenamiento, obsolescencia
- Capacidad: tiempo de corrida, capacidad de testeo, requerimientos laborales
- Sustentabilidad: consumibles, calibración, validación, mantenimiento preventivo

En general debe incluir:

- Calificación del Instrumento
- Validación de la tecnología alternativa
- Aptitud del método

- Calificación del instrumento

  Se deben seguir los lineamientos del capítulo <1058>

  1) Establecer en el URS los atributos críticos del instrumento
  2) IQ Calificación de la Instalación
  3) OQ Calificación de la Operación
  4) PQ Calificación de la Performance

- Validación de la tecnología alternativa. Criterios de validación.

  Los test cualitativos son binarios, y por esta razón no necesitan definir equivalencia en las unidades de medida.

Tabla 1 *Parámetros de validación según el ensayo microbiológico*

Parámetro de validación	Test Cualitativo	Test Cuantitativo
Exactitud	No	Sí
Precisión	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí
Límite de detección	Sí	Sí
Límite de cuantificación	Sí	Sí
Linealidad	No	Sí
Rango de operación	No	Sí
Robustez	Sí	Sí
Repetibilidad	Sí	Sí
Ruggedness	Sí	Sí
Equivalencia	Sí	Sí

Especificidad:

La especificidad de un método microbiológico cualitativo alternativo se define como su capacidad para detectar una variedad de microorganismos específicos de la tecnología, estos microorganismos se determinan considerando:

- El riesgo con respecto al producto y al paciente
- Cepas aisladas de ambientes productivos o de productos
- El tipo de tecnología del método alternativo
- Microorganismos que son representativos por sus características morfológicas y fisiológicas para el método y el producto

Para la demostración de especificidad se debe comparar la recuperación del *set* de microorganismos elegidos entre el método tradicional y el alternativo.

Para métodos basados en el crecimiento, se debe inocular con aproximadamente 100 ufc de cada microorganismo y para los métodos que no se basan en el crecimiento se usan controles positivos y negativos que demuestren que la materia extraña que pueda estar presente no interfiera con la recuperación. Para los métodos basados en el crecimiento todos los microorganismos recuperados deben identificarse.

Límite de detección

Es el menor número de microorganismos en un volumen definido de una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo condiciones experimentales determinadas. Según el método deben utilizarse los microorganismos especificados en los capítulos <51>[6], <61>[7], <62>[8], <63>[9], <71>[10].

Se exhiben dos métodos para demostrar el (LOD):

- Método 1: el límite de inoculación de los microorganismos elegidos a un 50% de recuperación en el método compendiado, una vez calculado realizar en paralelo ambos métodos y repetir la cantidad de veces necesarias para llevar a cabo un análisis estadístico adecuado Chi-cuadrado (α=0,05 y β=0,20).
- Método 2 (alternativo): con respecto al inóculo se pueden utilizar un rango de diluciones 1/10 o ½. Llevar a cabo el ensayo en paralelo al menos 5 réplicas en simultáneo para cada dilución, determinar el NMP de tres diluciones que prevean crecimiento positivo o negativo. Sugiere la utilización del test de Chi-cuadrado para el análisis de resultados.

Robustez

Es la capacidad del método de no afectarse por pequeños pero deliberados cambios en los parámetros del método. El usuario puede pedir estos datos al proveedor del método.

Tolerancia

Es el grado de precisión de los resultados obtenidos en el análisis de una misma muestra bajo una variedad de condiciones típicas que pueden darse en el laboratorio, como por ejemplo distintos analistas, instrumentos, lotes de reactivos. El usuario puede pedir estos datos al proveedor del método.

➧ Aptitud del método

Para cada nuevo producto a ser testeado por el método alternativo, debemos realizar la aptitud del método según <51>[6], <61>[7], <62>[8], <63>[9] y <71>[10], usando el número de unidades y las cantidades asignadas para la preparación de la muestra y la sensibilidad necesaria para demostrar que el producto no interfiere con la señal del método. Se deben realizar 3 ensayos independientes. Para los métodos cuantitativos, solo se requieren los parámetros de validación de la exactitud y la precisión. Para los cualitativos sólo la recuperación de microorganismos de desafío según se indica en el capítulo <62>[9], <71>[10] y <1227>[5].

Luego que se ha demostrado la equivalencia del método alternativo con el método compendiado con un producto, no es necesario demostrar la equivalencia del método con cada producto, solo se debe realizar el test de aptitud del método para cada nuevo producto.

Equivalencia

En general las nuevas tecnologías pueden utilizar distintos fundamentos y brindar otras señales distintas a las obtenidas con los métodos tradicionales. Es por esto que la validación de métodos alternativos debe incluir dos aspectos

- Demostración de equivalencia
- Calificación de equipos y métodos analíticos

Cuando comparamos dos procedimientos para ver su equivalencia o mejor performance, es necesaria evidencia estadística, demostrar la equivalencia o que el nuevo método cumple con el concepto de "no inferioridad".

En el caso de métodos que se utilizan para determinar recuentos, si la señal que emite es distinta a ufc no es posible encontrar una equivalencia.

Demostración de equivalencia

La USP nos brinda 4 opciones para establecer equivalencia

- Opción 1 procedimiento aceptable: no es una opción de equivalencia ya que no se requiere comparación del método alternativo con el tradicional, sino que puede usarse un material de referencia
- Opción 2 performance equivalencia: requiere una demostración de equivalente o superior con respecto a los parámetros de validación. Puede que nuestro método alternativo no cumpla con todos los parámetros de validación pero puede aceptarse si es que tiene ventajas considerables con respecto al tradicional
- Opción 3: equivalencia de resultados: se utiliza cuando se quiere saber si el método alternativo y el tradicional brindan resultados numéricos equivalentes. En el caso de métodos que no estén basados en el crecimiento es muy probable que se obtengan recuentos superiores al método tradicional, en estos casos se puede realizar una curva de calibración mostrando la correlación con el método tradicional
- Opción 4: Decisión de equivalencia: es similar a la equivalencia de resultados pero no es en base a datos numéricos sino en base a pasa/no pasa. La frecuencia de positivos/negativos generada no debe ser peor que el método tradicional con, propósitos de calificación, de ser considerada la inoculación con bajos niveles de microorganismos.

Demostración de equivalencia para un procedimiento microbiológico alternativo Cualitativo

Los test cualitativos nos dan dos respuestas el producto Pasa/No Pasa el ensayo. En esta categoría de decisión de equivalencia, Enfoque 1 se basa en la decisión de equivalencia. Enfoque 2 es una alternativa que convierte los resultados cualitativos en cuantitativos usando NMP, siempre usando la hipótesis de no inferioridad. (Test de no inferioridad de 1 cola)

Enfoque 1:

Usando resultados de presencia/ausencia: donde la proporción de muestras que producen una señal para el nuevo método (Pn) es mayor que alguna cantidad (Δ>0) menor que una proporción para un procedimiento farmacopeico(Pc). La hipótesis en este caso es:

$$Resultado = P_N - P_C \geq -\Delta$$

El margen de no inferioridad (Δ) en general es 0,20. Lo que buscamos es calcular un intervalo de confianza unilateral del 90% para Pn-Pc para cada nivel de biocarga. Se determina la no inferioridad si el límite de confianza inferior excede de -0,20. En una prueba cualitativa se realizan 3 determinaciones para cada microorganismo. Se deben utilizar como mínimo 75 muestras para obtener una potencia estadística (R) de 80%. Se divide el ensayo en tres niveles de inoculación bajo 1 ufc, medio 50% de las muestras son positivas y alto >75% dan positivas. Este enfoque se puede realizar con muestras independientes donde las muestras analizadas no son las mismas que las analizadas por el método tradicional, o por muestras apareadas donde N muestras han sido analizadas mediante los dos métodos y los resultados en este caso se analizan según una tabla de contingencia 2 x 2. (Tabla 2)

***Tabla 2**. Tabla de contingencia 2 x 2*

Procedimiento Alternativo	Procedimiento Farmacopeico		Total por fila
	Positivos	Negativos	
Positivos	X_{11}	X_{10}	X_A
Negativos	X_{01}	X_{00}	$N-X_A$
Todas las columnas	X_c	$N-X_C$	N

Donde N es el número total de muestras, X_A es la cantidad de muestras positivas del método alternativo, X_C es la cantidad de positivos del método tradicional.

Para ambos ensayos se concluye la no inferioridad si el Z calculado $>Z_\alpha$ donde $Z_\alpha$es el punto porcentual superior αde una distribución normal estándar .

Enfoque 2:

Comparación de resultados de NMP donde la hipótesis es:

$$\mu_A - \mu_C \geq log(R) \text{ o } antilog(\mu_A - \mu_C) \geq R$$

Pudiendo realizar los ensayos con muestras apareadas preferentemente utilizando la distribución *t* de student.

Demostración de equivalencia para procedimientos microbiológicos alternativos Cuantitativos

Una característica de un método alternativo es que la señal puede diferir significativamente de la ufc del método tradicional, siendo muy difícil realizar un ensayo de equivalencia tradicional. La USP sugiere dos criterios:

1. Los resultados del método alternativo tienen al menos una precisión aceptable
2. Los resultados del método alternativo están altamente relacionados con el método tradicional

Debe evaluarse la precisión y la correlación (linealidad) dando en este capítulo un ejemplo numérico para el cálculo de estos parámetros.

Los procedimientos alternativos pueden no presentar una correlación buena con respecto al procedimiento tradicional, en tal caso es aplicar el enfoque de equivalencia de la decisión debiéndose determinar una especificación para el método alternativo para que corresponda con la especificación farmacopeica para el nivel requerido de calidad microbiológica.

PARENTERAL DRUG ADMINISTRATION TECHNICAL REPORT #33

Este reporte técnico es una guía para evaluar, validar e implementar un método alternativo y rápido microbiológico. Comienza haciendo una reseña de los métodos tradicionales y de la perspectiva regulatoria en el mundo y las consideraciones de negocios, económicas y técnicas a tener en cuenta a la hora de elegir un método alternativo y lo importante de realizar un análisis de riesgo. Luego desarrolla las tecnologías alternativas existentes en el mercado, explicando sus fundamentos, beneficios y desventajas.

En cuanto al proceso de validación, empieza describiendo las actividades **pre-validación** donde se realizan pruebas que pueden ser en el laboratorio del usuario o del proveedor, con productos/matrices para constatar la compatibilidad equipo-muestra. También se debe auditar al proveedor para evaluar su capacidad por ejemplo de soporte técnico, mantenimiento del equipo, disponibilidad de repuestos y reactivos, Por otro lado hay que evaluar en esta instancia el retorno de la inversión (ROI).

Validación del Equipo, del Software y del método.

Esta etapa incluye

- DQ, OQ,IQ,PQ(incluye validación del método, y *suitability test*)
- FDQ Especificaciones Funcionales de Diseño e incluye evaluación del desempeño microbiológico y del sistema, deben cumplir con lo especificado en el URS:
    - Funcionalidad del método y del sistema
    - Input/output
    - Condiciones ambientales
    - Interfaces
    - Manejo y seguridad de datos
- URS requerimientos específicos del usuario
- POEs procedimientos operativos estándar
- Integración del sistema, manejo de datos, LIMS

Establecer criterios de Validación

Los criterios de validación son los mismos especificados en el capítulo <1223> de la USP [(2)]. Ver Tabla 1. La diferencia radica en que, a diferencia de la USP que realiza todos los ensayos sin la presencia de producto, el PDA #33[(4)]para el ensayo de equivalencia utiliza muestra, y si la muestra, por sus características e historial no suele tener carga microbiana se sugiere contaminarla. Para el ensayo de especificidad se sugiere utilizar mezcla de microorganismos y microorganismos estresados.

Consideraciones adicionales

Al final del Reporte Técnico, se desarrolla un tema no menor a tener en cuenta a la hora de implementar un método alternativo, y que son las fuentes de variabilidad que existen en microbiología. Estas fuentes son:

- **Error debido a la distribución de la muestra:** este error es el que más contribuye a la variabilidad microbiológica. Aunque hagamos una transformación logarítmica, los sistemas microbianos no van a seguir una distribución Gaussiana sino que tienden a una binomial negativa o a una Poisson y es muy difícil predecirlos especialmente en recuentos bajos.
- **Arreglos celulares:** así mismo que una UFC proviene de una sola célula sin considerar que las células no están uniformemente distribuidas en la muestra y sin considerar que los microorganismos se agrupan de apares, o en cadenas, tetradas, *clusters* irregulares o forman *biofilms*.
- **Actividad metabólica:** los microorganismos en la muestra pueden encontrarse estresados debido a haberse expuesto a las condiciones de procesamiento, ambientales, interferentes. Inhibidores o neutralizantes utilizados en el ensayo microbiológico. Es por esto que a la hora de validar un método alternativo se deben utilizar microorganismos estresados para determinar los tiempos de incubación.

Guía para cambiar criterios de aceptación

Muchos de los métodos utilizados en los programas de análisis ambientales no cuentan con estándares de referencia haciendo muy difícil su comparación con los métodos alternativos, ya que muchos de ellos por su parte pueden detectar microorganismos viables pero no cultivables y también van a emitir resultados distintos a las UFC, como eventos fluorescentes, haciendo muy difícil la comparación de ambos métodos. En algunos casos los datos del *trending* se pueden desfasar debido a las diferencias en los recuentos obtenidos, es por esto que deben establecerse los nuevos límites de alerta y acción en base a análisis de riesgo basándose en los datos de los *trendings* obtenidos a partir de ambos métodos y en el tipo de productos [(11)].

EUROPEAN PHARMACOPEIA 5.1.6

La Farmacopea Europea en su capítulo 5.1.6[3] comienza con una introducción general donde divide los tipos de determinaciones:

- Métodos cualitativos para la determinación de presencia o ausencia de microorganismos.
- Métodos cuantitativos para la enumeración de microorganismos.
- Métodos para la identificación de microorganismos.

Luego describe los principios generales de los métodos alternativos dividiéndolos en tres:

- Métodos basados en el crecimiento donde la señal detectable es alcanzada luego de un período de incubación.
- Métodos basados en la medición directa.
- Métodos basados en el análisis de los componentes celulares donde la expresión de un componente celular específico ofrece una medida indirecta de la presencia de un microorganismo.

Lo interesante de esta parte del capítulo es que para cada uno de los métodos describe los principios, aspectos críticos y usos potenciales, información útil a la hora de elegir un método alternativo.

Requerimientos generales de validación

Cuando un equipo es crítico para la aplicación de un método alternativo, el equipo, incluyendo el hardware y software, deben ser calificados con:

- Calificación de diseño QD
- Calificación de la instalación IQ
- Calificación de la Operación OQ
- Calificación de la Performance PQ

Los parámetros necesarios en la validación de un método alternativo están divididos según sea cuantitativo o cualitativo, y son los mismos citados en la Tabla 1 de este capítulo.

Requerimientos específicos de una validación

Background: existen 2 niveles de validación, la validación primaria que es realizada por el proveedor del nuevo método y la validación para el uso previsto, que es la verificación de la idoneidad o aplicabilidad del método en una situación dada, es responsabilidad del usuario.

Validación primaria: el principio de la detección tiene que estar bien descripta por el proveedor y debe por lo menos abarcar los siguientes aspectos:

- Pre tratamiento de la muestra o microorganismo
- Tipo de respuesta
- Especificidad de la respuesta
- Límite de detección
- Rango
- Linealidad de la respuesta
- Exactitud y precisión de la respuesta
- Robustez del método
- Límites de idoneidad

Validación de un método microbiológico alternativo:

- Análisis Riesgo-beneficio
- Validación para el uso previsto: El método alternativo debe aplicarse en el procedimiento utilizado y con la muestra a analizar y debe cumplir con lo siguiente:

- Compatibilidad de la respuesta con la preparación de la muestra
- Límite y rango de detección de acuerdo al tamaño y disponibilidad de la muestra
- Especificidad de la respuesta teniendo en cuenta la influencia de los ingredientes de la muestra
- Linealidad de la respuesta teniendo en cuenta todos los tipos de muestras a analizar
- Exactitud y precisión de la respuesta teniendo en cuenta todos los tipos de muestras a analizar.
- Robustez del método teniendo en cuenta todos los tipos de muestras a analizar.

Luego en el capítulo 5.1.6[3] se describen para los distintos métodos alternativos los riesgos-beneficios y la validación para el uso previsto.

Ejemplo de la validación de un método alternativo

Esta parte del capítulo es muy interesante ya que de los tres documentos, este es el único que brinda un ejemplo práctico de la validación de un método alternativo utilizando la implementación de la bioluminiscencia como método alternativo cualitativo semicuantitativo.

Background

Método Semicuantitativo: al sembrar el equivalente a 1 g o ml de producto y por otra parte el equivalente a 0,1 g o ml de producto, si en el primero se obtiene un resultado positivo y en el segundo uno negativo, se puede decir que el recuento de los microorganismos es menor a 10 microorganismos pero mayor o igual a 1 microorganismo por gramo de muestra.

Calificación de la Performance de un método alternativo

- *Especificidad*: testear por lo menos los microorganismos descriptos en el capítulo 2.6.12, por triplicado para cada uno de ellos
- *Límite de detección* (sólo para semicuantitativo o cualitativos): se prepara un inóculo bajo (aproximadamente 5 ufc) de cada microorganismo a testear haciendo 5 repeticiones para cada uno de ellos, en paralelo el método tradicional y el alternativo. Se puede utilizar el test χ^2 para compararlos. Un método alternativo que se sugiere es realizar 5 diluciones al medio comenzando desde 10 ufc hasta 0,75 ufc haciendo 5 ensayos independientes, siendo el límite de detección la última dilución positiva.
- *Límite de cuantificación*: Puede ser efectuado al mismo tiempo que el ensayo de linealidad y es la menor concentración del rango elegido que satisface los criterios de linealidad exactitud y precisión
- *Precisión*:
    - Evaluación cuantitativa: para cada microorganismo realizar cinco réplicas de por lo menos la concentración media del rango y repetir este procedimiento dos veces más. Calcular el Coeficiente de Variación del método alternativo.
    - Evaluación cualitativa o semicuantitativa: situarse en el límite de detección y analizar la frecuencia de los resultados positivos que debe ser 100 % e igual o superior al método tradicional.
- *Linealidad*: para cada microorganismo preparar 5 concentraciones de microorganismos en el rango del método alternativo, Realizar ambos métodos en paralelo. Repetir el ensayo dos veces más. Analizar la regresión mediante el Test de Fisher y si no es posible, utilizar r^2 coeficiente de correlación y la pendiente, para comparar ambos métodos.
- *Exactitud*:
    - *Evaluación cuantitativa*: se puede obtener de los datos del ensayo de linealidad para cada microorganismo utilizar de 3 a 5 concentraciones dentro del rango lineal. Realizar un test de Student con 13 grados de libertad y 5 % de error para comparar la pendiente (valor=1) y la ordenada al origen (valor =0).
    - *Evaluación cualitativa o semicuantitativa*: usar los resultados obtenidos para calcular el límite de detección. Calcular la proporción de falsos negativos del método alternativo y del método tradicional, la proporción de falsos negativos del método alternativo debe ser igual o menor que la del tradicional.

- Validación de la intención de uso: para el caso de bioluminiscencia en el cual se realiza un paso de pre-enriquecimiento, no hace falta evaluar la exactitud y límite de detección en presencia de producto. En este caso la validación se divide en tres fases:
    - Fertilidad de los medios en presencia de producto: inocular para cada microorganismo no más de 100 ufc en el medio con el producto para comprobar que el producto no inhibe el desarrollo de los microorganismos de prueba.
    - Buscar interferencias por parte del producto: la idea es ver que el producto no aumente la señal o la disminuya (falsos positivos, falsos negativos)
    - Análisis del producto en paralelo con el método tradicional y el método alternativo: se realizan tres ensayos independientes y en por lo menos dos lotes distintos. Tiene que haber correlación entre ambos métodos.

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA

Con respectos a los métodos de identificación, en la USP el capítulo <1113>[12]"Caracterización, identificación y tipificación de cepas microbianas", describe la metodología y los criterios para la verificación de métodos de identificación.

Describe tres situaciones:

1) Usar un sistema existente para el análisis paralelo de aislamientos microbianos obtenidos del análisis de rutina, en este caso el número de aislamientos analizados puede llegar a 50.
2) Analizar 12-15 cultivos madre representativos conocidos realizando un número total de 50 pruebas.
3) Confirmar que 20 a 50 identificaciones de organismos, incluyendo 15 a 20 especies diferentes concuerden con los resultados realizados en un laboratorio de referencia de una muestra dividida.

Las pruebas de verificación más importantes son exactitud y reproducibilidad:

% de Exactitud = (Nro de resultados correctos/Nro total de resultados) x 100

% de Reproducibilidad = (Nro de resultados correctos que concuerdan entre sí/Nro total de resultados) x 100.

Luego este capítulo menciona otras pruebas que pueden aplicarse como sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo. Basándose en la norma ISO 5725-1[13] y 5725-2[14] y utilizando una tabla de contingencia de dos filas y dos columnas nos indica cómo calcular la Inclusividad(%), Exclusividad(%), Predictividad positiva(%), Predictividad negativa (%), Exactitud analítica (%), índice Kappa.

El usuario debe establecer criterios de aceptación adecuados de exactitud y reproducibilidad, tomando en cuenta las capacidades del método.

CONCLUSIONES:

Está claro que la validación y posterior implementación de un método microbiológico alternativo no es una empresa fácil. No sólo por el elevado costo de equipos y reactivos sino por todo el trabajo adicional que esto implica. Consta de varias etapas comenzando por la inquietud inicial de querer mejorar la calidad de nuestros resultados. Debemos trazar un plan de implementación con metas a corto, mediano y largo plazo. Buscar mucha bibliografía, tener en cuenta cuáles son nuestras necesidades (cada laboratorio es un mundo) y encontrar el o los métodos alternativos adecuados para cubrirlas. Tenemos que establecer un vínculo afianzado con nuestro proveedor y buscar la manera de presentar nuestro proyecto frente a nuestra empresa y ante la autoridad regulatoria, basándonos en análisis de rentabilidad/garantía de calidad y en la reglamentación disponible, armando un análisis estadístico robusto y adecuado para demostrar que nuestro método es igual o superior al tradicional sin olvidar que nuestro motor de cambio no solo es tener resultados más rápidos, sino lograr la mejora en la calidad de nuestros resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. La estructura de las revoluciones científicas (1962). Thomas Kuhn <https://es.wikipedia.org/wiki/La_estructura_de_las_revoluciones_cient%C3%ADficas> <https://es.wikipedia.org/wiki/Thomas_Kuhn>

2. United States Pharmacopeia <1223>. Validation of Alternative Microbiological Methods.

3. European Pharmacopeia chapter 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality.

4. Parenteral Drug Administration Technical Report #33 (2013). Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbial Method.

5. United States Pharmacopeia <1227>. Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles.

6. United States Pharmacopeia <51>. Antimicrobial Effectiveness Testing.

7. United States Pharmacopeia <61>. Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Test.

8. United States Pharmacopeia <62> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Test for Specified Microorganisms.

9. United States Pharmacopeia <63> Mycoplasma Test.

10. United States Pharmacopeia <71> Sterility Test.

11. Hussong, D., and Mello, R. 2006. Alternative Microbiology Methods and Pharmaceutical Quality Control. American Pharmaceutical Review. Vol. 9(1): 62-69.

12. United States Pharmacopeia <1113>. Microbial Characterization, Identification and Strain Typing.

13. ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions.

14. ISO 5725-2 Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.