ISBN 978-987-46701-4-4

Sección VI.
Aseguramiento de la calidad y Seguridad en el Laboratorio de Microbiología.

página

Capítulo VI.1. **Documentación y Registros** **529**
Patricia Domínguez

Capítulo VI.2. **Investigación de las Desviaciones de los Resultados Microbiológicos** **537**
Mónica Lagomarsino

Capítulo VI.3. **Microorganismos objetables** **549**
Sergio Iglesias

Capítulo VI.4. **El Complejo *Burkholderia cepacia*** **557**
José Degrossi

Capítulo VI.5. **Evaluación del Riesgo de Contaminación Microbiológica** **573**
Mónica Lagomarsino

Capítulo VI.6. **Incertidumbre de la Medición asociada a los Ensayos de Resultados Ensayos Microbiológicos** **582**
Susana Carnevalli

Capítulo VI.7. **Capacitación y Entrenamiento** **603**
Patricia Domínguez

Capítulo VI.8. **Auditoría en el Laboratorio de Microbiología** **609**
Néstor O. Aversa

Capítulo VI.9. **Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología** **622**
Adriana Bernacchi, Silvina Fernández Giuliano, Susana Fink, Susana Molgatini, Leonora Nusblat, Sandra Pampuro, Catalina Romano, Érika Schabes y Edith Valles

Capítulo VI.1.

Documentación y Registros

Patricia Domínguez

Introducción

Tipos de documentos y registros

Archivo

Sistemas computarizados

Conclusiones

Referencias

Introducción

Es conocido desde hace tiempo en la industria farmacéutica que todo debe estar perfectamente documentado como parte de la Buenas Prácticas de Manufactura internacionales y locales.

Dentro de las mismas existen las Buenas Prácticas de Documentación que son la base fundamental de todo Sistema de Calidad actual.

En realidad hoy el concepto de Sistema de Calidad ya está siendo reemplazado por el de Gestión de Calidad, en donde el sistema de documentación es un proceso más dentro del resto de los procesos de un laboratorio. Esto implica un manejo de todo tipo de documentos de manera segura, adecuada y eficiente cuya importancia radica en evidenciar de forma clara y concisa todas las operaciones del laboratorio, su registro y su archivo para cumplir con normativas de calidad y legales.

En este capítulo se describirán los distintos documentos, registros y su archivo que deben formar parte del sistema de Gestión de Calidad de un laboratorio de Microbiología Farmacéutica a los efectos de garantizar que los productos manufacturados cumplen con los requisitos de calidad exigidos.

Esto debe lograrse con un sistema de Documentación que no sea muy burocrático como tampoco demasiado simple, sino que la evidencia documental y los procedimientos asociados estén en su justa medida.

Tipos de documentos y registros

Los tipos de documentos que encontramos en un Laboratorio de Microbiología pueden dividirse en dos grandes grupos:

- Documentos Maestros
- Registros de datos crudos

Documentos maestros:

Los Documentos Maestros son los que establecen lineamientos a seguir, proveen instrucciones claras sobre las operaciones dentro del laboratorio.

Las versiones originales de estos documentos son administradas por un sector centralizado, encontrándose en el laboratorio copias autorizadas.

El laboratorio participa en el circuito de emisión y revisión de aquellos documentos que aplican al sector directamente o en aquellos en los que el sector de Microbiología forma parte de un equipo multidisciplinario como puede suceder cuando se trata de calificaciones de ambientes y equipos o validaciones de procesos y limpieza.

Entre los Documentos Maestros tenemos:

- Manual y / o Políticas de Calidad
- Procedimientos Estándar de Operación que aplican específicamente al laboratorio de Microbiología, más allá de los procedimientos generales de toda la Planta:

    Procedimientos de validación, calificación, calibración de equipos.

    Procedimientos de limpieza y su validación microbiológica.

    Procedimientos de esterilización y de descontaminación.

    Manejo de residuos. Bioseguridad.

    Mantenimiento de cepas patrones.

    Identificación bacteriana.

    Valoraciones microbiológicas.

    Monitoreos ambientales y de servicios de planta y del laboratorio de microbiología.

    Manejo de resultados fuera de especificación.

    Cálculo de tendencias.

    Mantenimiento de Bitácoras de equipos.

    Manejo de Desvíos.

    Transferencia de métodos analíticos.

    Manejo de controles de cambio.

    Uso de Indicadores de esterilización

    Control de Calidad y Conservación de medios de cultivo.

    Evaluación de desinfectantes.

    Coloraciones para microscopía

    Manejo de reactivos.

    Manejo de documentación y registros de datos crudos.

    Entrenamiento y Capacitación.
- Métodos de análisis
- Especificaciones analíticas a cumplir
- Planes de muestreo
- Masters de Preparación de medios de cultivo

Los requisitos generales de los Documentos Maestros se detallan a continuación:

- Los documentos deben estar diseñados, preparados, revisados y aprobados, y deben cumplir con lo establecido y en un todo de acuerdo con lo registrado ante las autoridades sanitarias.
- Deben tener firma de aprobación, versión y fecha de vigencia.

- No pueden ser cambiados una vez que se hayan autorizados a menos que sea evaluado a través de una apropiada gestión de cambios.
- Su contenido debe ser claro, legible, libre de errores. Es recomendable seguir un *lay out* preestablecido que facilite su comprensión. Este *lay out* puede incluir objetivo, alcance, definiciones, desarrollo o procedimiento en sí, responsabilidades, documentación y referencias.
- La numeración y / o identificación del documento debe ser inequívoca por tipo de documento.
- La reproducción de los documentos usados para registros provenientes de Documentos Maestros, deben ser copia fiel de los mismos y que no existan diferencias entre ambos. Cuando están asociados a procedimientos deberán estar incluidos a modo de ejemplo dentro del documento que le dio origen.
- Los Documentos Maestros como procedimientos estarán gestionados centralmente por una central de documentación y son distribuidos al laboratorio de Microbiología, quien a su vez debe llevar un cuidadoso control de los mismos.
- Los procedimientos deben estar actualizados de acuerdo a lo que se hace realmente.
- No deben tener escrituras a mano, ni *post its* adheridos.
- Los documentos deben estar revisados para mantenerlos actualizados y guardados en un lugar adecuado y exclusivo para tal fin dentro del laboratorio, pero a la vez que sean de fácil acceso a los analistas para su consulta en cualquier momento.
- Debe existir un adecuado control para evitar el uso de versiones obsoletas.
- Las hojas deben estar correctamente numeradas y debe constar el número total de las mismas.
- Debe estar estandarizado el formato de las fechas.
- Es recomendable que exista un listado de todos los documentos que aplican en el sector.

Registros de datos crudos

Los registros de datos crudos documentan apropiadamente todas las operaciones que han sido realizadas para permitir una trazabilidad no ambigua. Se debe registrar lo más detalladamente posible dichas operaciones como los medios de cultivo, reactivos, soluciones o estándares utilizados, de manera de asegurar una investigación adecuada para poder reconstruir los pasos seguidos en caso de alguna auditoría o investigación posterior por cualquier motivo que sea necesario, ya sea por temas de calidad, legales o regulatorios.

Entre los registros de datos crudos podemos mencionar:

Análisis propiamente dicho

Controles y calificaciones de equipos

Bitácoras de equipos

Preparación y control de calidad de los medios de cultivo

Monitoreos de ambientes y servicios de Planta

Esterilizaciones y Descontaminaciones

Valoraciones microbiológicas

Validaciones

Resultados fuera de especificación

Cálculos de tendencias

Mantenimiento de cepas de referencia y pruebas de identificación microbiana en general

Preparación de soluciones y reactivos

Protocolos de validaciones

Los requisitos generales de los registros son:

- Los registros de datos crudos deben ser legibles, indelebles y realizados preferentemente con tinta de color azul. No deben completarse con lápiz.
- Deben tener suficiente espacio para registrar el dato crudo correspondiente.
- El *lay out* de los mismos deberá estar establecido en el procedimiento que le da origen, y su contenido dependerá de lo que deba registrarse.
- Cualquier corrección debe realizarse con firma, nota aclaratoria y fecha de la corrección y se debe realizar una tachadura que permita ver el dato original. No puede usarse correctores líquidos.
- Los registros deben realizarse o completarse al momento de realizar la acción y no deben ser completados con anterioridad.
- No debe haber campos dejados en blanco, cuando sea necesario los campos en blanco deben estar correctamente tachados en diagonal para que no pueda registrarse nada *a posteriori*.
- Debe existir un registro de firmas que permita identificar las realizadas en los registros.
- Los registros de datos relevantes deben ser apropiadamente supervisados:
    - Verificación siguiendo el principio de los cuatro ojos: operador y una segunda persona firman al mismo momento en simultáneo si la actividad así lo requiere.
    - Revisión por una segunda persona siguiendo el principio del doble control: una segunda persona controla y firma la adecuabilidad de los cálculos realizados y de los datos ingresados y / o transcriptos.
    - Las correcciones también deben ser reverificadas.
- Si se usa un cuaderno deberá esta foliado previamente. Si se usan hojas de análisis preimpresas provenientes de un sistema informático deberán estar compiladas, numeradas con el formato *1 de n* páginas.
- La emisión tanto de las hojas de análisis como de los cuadernos debe ser realizada por personas autorizadas.
- Las firmas manuscritas no pueden ser reemplazadas por un sello.
- Las impresiones de los instrumentos deben estar incluidas en los datos crudos, ya sea pegados o como anexo con firma y fecha.
- Cuando se registren datos repetitivos no pueden usarse comillas y tampoco deben usarse asteriscos en las modificaciones.

Archivo

Una cuestión muy importante para tener en cuenta es el archivo de la Documentación Maestra y de los registros.

Los Documentos Maestros en general, se archivan en forma centralizada en el sector responsable de la administración de los mismos.

Normalmente en el laboratorio existen copias autorizadas de esos documentos que deberán archivarse en un área exclusiva para tal fin.

Por otro lado, está el archivo de los registros de datos crudos, los cuales podrán permanecer en el laboratorio durante un periodo de tiempo establecido, para posibles consultas, por ejemplo durante el año en curso y un año anterior y luego serán trasladados al archivo centralizado.

También los resultados de análisis de materiales y productos quedarán registrados en las hojas de análisis de la correspondiente documentación de lote cuyo archivo también estará centralizado.

Los requisitos que deberán cumplir estos archivos corresponden a los de cualquier ambiente de este tipo, cerrado con llave con acceso controlado con uno o dos responsables de acceso, un procedimiento que administre los diferentes lugares de guardado, protecciones contra incendio y en condiciones edilicias adecuadas y de limpieza frecuente, de manera de asegurar la preservación de los documentos.

Los plazos de almacenamiento de los documentos seguirán los lineamientos GMP internacionales, pero en general según la disponibilidad de guardado oscila entre los cinco y diez años, teniendo en cuenta los períodos de vida útil de productos y materiales.

Sistemas computarizados

En la actualidad hay que destacar los sistemas computarizados en la administración de todos estos tipos de documentos y registros.

Estos sistemas permiten tener conectado al laboratorio con el resto de los laboratorios de control de calidad y con los sectores de documentación y de liberación de lote.

En general los resultados se ingresan en un sistema que maneja las especificaciones de análisis incluyendo las de monitoreos de planta y la generación de certificados de análisis.

De esta manera se puede generar una orden de análisis para cada laboratorio incluyendo Microbiología, donde una vez realizado el análisis, se ingresan los resultados en el sistema. Hay un doble chequeo por una segunda persona calificada que podría ser un supervisor, dependiendo del organigrama de la Compañía, una aprobación por parte del responsable del laboratorio y una liberación final del todo el lote con la generación del certificado de análisis en forma centralizada que en muchos casos estos sistemas permiten que se realice en forma automática.

Además del uso del sistema se pueden usar hojas de papel adicionales foliadas donde deberán agregarse registros de pesadas, pH, temperaturas de estufas o heladeras cuando corresponda.

Los requisitos que deben cumplirse en el manejo de este tipo de sistemas son:

- Acceso restringido por usuarios. Ingreso con claves que deben tener un número mínimo de caracteres y de distinto tipo como números y letras.
- Que exista firma electrónica según los requerimientos del CFR 21.
- Que dispongan de sistema de *audit trail* en donde puede chequearse qué usuario hizo qué transacción en un preciso momento.
- Que el sistema está validado: esto implica que esté perfectamente documentado como parte del ciclo de vida del sistema. Los documentos que se deben generar son:

    Plan de validación

    Especificación de diseño

    Especificación de usuario

    Especificación funcional

    Definición de usuarios y perfiles

    Análisis de riesgo

    Plan de testeo

    Protocolo de testeo aprobado

    Plan de capacitación

    Capacitación de los usuarios

    Liberación del sistema para uso

    Procedimiento de *back up*

    Manejo de *disaster recovery*

    Manejo de cambios

    Manejo de errores y desvíos.

También cabe mencionar los sistemas computarizados que hoy en día manejan muchos de los equipos de laboratorio como registros de temperaturas e identificación bacteriana entre otros, que deberán cumplir con los mismos requisitos anteriormente mencionados para el manejo de documentos y datos.

Integridad de datos (*Data Integrity*)

Actualmente el tema de la integridad de datos está teniendo mucha relevancia en función de las nuevas exigencias tanto de la FDA como de la Comunidad Europea.

Hay que considerar dos tipos de Integridad de datos, por un lado la integridad de los datos crudos registrados en papel p sea lo que llamamos *Paper based Data Integrity,* y por otro lado la integridad de datos registrados en sistemas informáticos o *IT Data Integrity*.

En ambos casos se deben seguir los principios de ALCOA + o PLUS que se definen como

A: Atributable: es decir que los datos sean atribuibles
Esto significa que siempre sean atribuibles a un paso o actividad del lote o proceso de análisis en particular y a un operador en particular, por ejemplo debe registrarse siempre la firma de quien ejecutó el paso o proceso.

L: Legible: que los datos sean legibles
Esto quiere decir que los registros deben ser comprensibles, cuando son manuscritos que sea con letra clara, que la información sea precisa y no ambigua, en caso de que se realicen enmiendas que sean fácilmente identificado el dato original y el dato resultado de la enmienda.

C: Contemporaneusly recorded o sea que sean registrados al momento en que son generados, es decir todo dato o actividad GMP debe ser registrada en forma individual y contemporánea.
O sea, todas las tareas deben ser registradas en el momento exacto en que son realizadas. Esto es particularmente importante en el laboratorio de microbiología cuando se realiza la lectura de placas, en especial de recuento, en donde lo correcto es registrar el valor de cada lectura de cada placa al momento de hacerlo y no leer los recuentos de las placas todas juntas y luego registrarlo como muchas veces se hace con el afán de ganar tiempo.

O: Original o True copy o sea que los datos sean originales o copia fiel del registro original.
Al referirse que los datos sean originales quiere decir por ejemplo que en las enmiendas pueda reconocerse el dato original y la corrección por ejemplo realizando una tachadura del dato original pero que éste pueda ser visualizado. En el caso de transcribirse datos, los datos originales siempre deben estar adjuntos. No debe descartarse ni destruirse ningún tipo de información, todo sirve de historia para el producto o análisis en cuestión, incluso un dato corregido o salvado. Es por eso que no se permite el uso de trituradoras de papel o al menos que se encuentren en lugares de acceso restringido para ser usado solo por personal autorizado.

A: Accurate que significa que los datos sean exactos y precisos. Como los datos crudos son el reflejo de las acciones que realizamos, deben reflejar quien hizo la tarea, cuando, y que describa claramente el resultado o conclusión de manera que no presente ambigüedades.

Como parte del + o Plus, debemos considerar también las siguientes definiciones:

C: Complete, que los datos estén completos y disponibles. Esto implica que debe haber un chequeo, o también la denominada conciliación final de la documentación está toda completa, es decir que los documentos y registros asociados a un determinado análisis estén todos incluyendo posibles repeticiones o reanálisis.

C: Consistent o sea que los registros sean consistentes con las etapas del proceso o análisis que se han llevado a cabo.

E: Enduring esto quiere decir que los datos sean duraderos y que estén almacenados de manera que no se pierdan con el tiempo, ya sea en papel o en forma electrónica.

A: Available, que los datos estén disponibles o accesibles para ser revisados o auditados durante todo el plazo de almacenamiento de los mismos.

En el caso en particular de análisis realizados con la ayuda de sistemas informáticos existen algunos requisitos más a cumplir como:

Que los mismos no permitan el borrado de los datos.

Que cada usuario tenga su propio y único usuario para poder ingresar al mismo.

Que existan funciones dentro del sistema segregadas por usuario.

Que la evaluación de los registros quede guardada electrónicamente como también pueda imprimirse.

Que exista una evaluación de los parámetros críticos.

Que exista la posibilidad de guardado de los datos en forma electrónica de manera simultánea.

Que el sistema realice *back up* de los datos

Que el sistema tenga la posibilidad de realizar *audit trail* y si lo tiene no debe ser posible desactivarlo.

Audit Trail:

El *audit trail* es la cronología de quién, qué, cuándo y por qué de un evento en un documento o sistema, y permite visualizar acerca de la generación del dato, la modificación o borrado del mismo, como así también el acceso o uso del sistema, y visualiza la posibilidad de cambio de parámetros clave. Es por eso que el *audit trail* debe ser revisado ya sea en forma aleatoria o sistemática dependiendo del caso para poder chequear que se registró y que no hubo alteraciones a los datos originales.

Muchos de estos conceptos no son nuevos, pero hoy adquieren más importancia porque a través de los mismos podemos garantizar la calidad y la integridad de los resultados que se generan en el laboratorio, sobre todo en cuanto al hecho de que los mismos no han sido manipulados, es por eso que las agencias regulatorias están poniendo tanto foco en este tema actualmente.

Por lo expuesto es muy importante crear una cultura de *Data Integrity* dentro de la organización y del laboratorio con los analistas y personal responsable para implementar y seguir estos requisitos, a través de la capacitación, seguimiento de errores, controles en sistemas informáticos y documentación.

Conclusiones

Por todo lo anteriormente expuesto es importante mantener un adecuado Sistema de Documentación con documentos maestros que son la base para el cumplimiento de los procesos y de las regulaciones locales e internacionales. También es importante un adecuado manejo de los registros o datos crudos para asegurar la trazabilidad de todas las operaciones realizadas.

El Laboratorio de Microbiología, al formar parte del sistema de Gestión de Calidad debe participar en el cumplimiento de los requisitos anteriormente expuestos a lo largo de este capítulo.

Un correcto Sistema de Documentación y la aplicación de Buenas Prácticas en este campo sólo son posibles cuando se cuenta con las herramientas informáticas necesarias, capacitación permanente y por sobre todo el compromiso del *Management* en implementar, administrar y supervisar dicha gestión de acuerdo a los lineamientos GMP.

Referencias

1. European Commission. Good Manufacturing practice. Medicinal Products for Human and Veterinary use. Chapter 4. (2011)
2. World Health Organization, Technical Report Series: WHO TRS 908 *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products*: Annex 4. (2003)
3. 21 Code of Federal Regulations CFR 211 Subpart J
4. Pharmaceutical International Convention: PIC/s Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products Part I Chapter 4, 6 and Part II Chapter 6 and Annex 11. (2009)
5. Disposición 2819/ 2004. Bu*enas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/ Exportadores de Medicamentos* ANMAT (2004)
6. MHRA GxP Data Integrity Definitions and Guidance for Industry, Draft version July 2016.
7. EMA Good Manufacturing Practice (GMP) Guidance to Ensure the Integrity of Data (Questions &Answers), Aug. 2016.
8. FDA. Data Integrity and Compliance with cGMP. Guidance for industry. Draft Guidance. April 2017.

Capítulo VI.2.

Investigación de las Desviaciones de los Resultados Microbiológicos

Mónica Lagomarsino

Introducción

Alcance

Objetivos de la investigación

Criterios de aceptación

Proceso general de la investigación

Investigación en el laboratorio

Investigación fuera del laboratorio

Conclusión

Bibliografía

Introducción

La expresión en inglés *Out-of-Specifications* (OOS), o "Resultados fuera de Especificaciones" fue utilizada por primera vez por el juez Alfred M. Wolin en 1993 en la corte durante el juicio del gobierno de los Estados Unidos contra *Barr Laboratories*, conocido como *caso Barr* [1]. Una de las consecuencias de ese juicio fue que se estableció una guía acerca de cómo se debe proceder cuando se obtienen resultados aberrantes, o se detectan errores en los ensayos, o cuando los resultados están fuera de los límites preestablecidos.

Como resultado del fallo de la corte, en el año 1998 la *Food & Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos publicó un borrador de una guía titulada *Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Result for Pharmaceutical Production*. Según el alcance de la misma, el término *OOS result* se refiere a todos los resultados que están fuera de las especificaciones o de los criterios de aceptación preestablecidos. En dicho borrador la única mención a los resultados microbiológicos estaba bajo el título *Averaging*, donde se mencionaba que, debido a la variabilidad innata de los sistemas biológicos, los resultados microbianos deberían ser preferentemente promedios de más de un resultado.

En el año 2006 se publicó la guía final [2], en cuyo alcance se incluye sólo la investigación de los resultados de análisis químicos; los de los ensayos microbiológicos y otras valoraciones biológicas fueron expresamente excluidos. Sin embargo muchos laboratorios y auditores aplican los conceptos de la guía vigente a los resultados de los ensayos microbiológicos.

Para diferenciar los resultados microbiológicos de los químicos que están fuera de límites, se ha comenzado a utilizar informalmente para los primeros la expresión en inglés *Microbiological Data Deviation* (MDD) en países de habla inglesa. Esta expresión que no utiliza el término "Especificación", parece ser más adecuada para los resultados microbianos; la razón es que los microorganismos son sistemas biológicos, y como tales tienen una variabilidad inherente a su naturaleza, y su distribución en el producto por lo general no es uniforme.

Los resultados químicos fuera de especificación se denominan frecuentemente en países de habla hispana como RFE. No hay aún una denominación en uso para los resultados microbiológicos, por eso en adelante nos referiremos a estos resultados fuera de límites como *Desviación de los Resultados Microbiológicos*, pero continuaremos utilizando la sigla en inglés MDD, sólo para no crear confusión.

La farmacopea de los Estados Unidos (US. Pharmacopeia) se refiere a las no conformidades microbiológicas en su capítulo <1117>, bajo el título "*Interpretation of assay results*" [3].

La Parenteral Drug Association (PDA) al momento de la redacción de este capítulo, se encuentra trabajando en la publicación de un Reporte Técnico referido a la investigación de los MDDs.

Alcance de las Desviaciones de los Resultados Microbiológicos

Los siguientes son algunos de los resultados microbiológicos que deberían ser investigados:

- Recuento de Microorganismos Aeróbicos Totales y Recuento Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras, cuando superan los criterios de aceptación preestablecidos.
- Detección de Microorganismos Específicos, cuya ausencia debe ser investigada de acuerdo a las farmacopeas o a métodos propios, y que en general son "indicadores" de contaminación.
- Detección de Microorganismos Objetables, cuya ausencia no está explícitamente indicada en farmacopeas, pero que sin embargo deben estar ausentes, o por la naturaleza del producto, o por la vía de administración del medicamento, o por el tipo de pacientes o las condiciones de salud de aquellos a quienes está destinado el producto.
- Resultados de Recuento Aeróbico Total o de Recuento Combinado de Hongos y Levaduras cuando, a pesar de cumplir con los criterios de aceptación preestablecidos, son muy diferentes a los obtenidos históricamente. A esos resultados se los denomina "out-of-trend" (OOT) o resultados fuera de tendencia.
- Presencia de contaminación microbiana en un producto que debe ser estéril, independientemente de cuál es el contaminante.
- Excursiones o resultados OOT obtenidos durante el monitoreo microbiológico ambiental y de aguas de uso farmacéutico.
- Resultados de ensayos de Promoción de Crecimiento de medios de cultivo que no cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos.
- Controles negativos de ensayos de esterilidad o de ensayos de productos no estériles, que presentan desarrollo microbiano.
- Cualquier otro resultado en el laboratorio de microbiología que merezca ser seguido para encontrar las causas y así corregirlas, como por ejemplo resultados de valoración de antibióticos, de conteo de esporas de Indicadores Biológicos, de fallas de esterilización de medios y materiales, etc.

De acuerdo con la USP capítulo <1117> [3], los resultados microbiológicos pueden ser difíciles de interpretar por varios motivos:

- Hay microorganismos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son contaminantes habituales en el ambiente no sólo de áreas de control sino también en las de producción.
- El analista puede introducir contaminación microbiana durante el muestreo o el análisis.
- Los microorganismos pueden no estar homogéneamente distribuidos dentro de la muestra de producto o en el ambiente o agua. Particularmente en los sistemas de agua se adhieren a las superficies formando *biofilms*, o biopelículas.
- La contaminación microbiana está sujeta a cambios en su número por el desarrollo o pérdida de viabilidad o ambos, de acuerdo a las características del producto en que se encuentren.

Además de los inconvenientes citados, puede haber potenciales resultados aberrantes producidos por:

- la diferencia entre los duplicados o triplicados de las placas de recuento, cuando supera un límite que previamente debe ser establecido en el laboratorio,
- la identificación de un contaminante en un *habitat* en el que no se esperaba encontrarlo.

Por esas razones los ensayos microbiológicos deben ser realizados extremando los cuidados, y el analista debe estar debidamente entrenado para prevenir la contaminación de la muestra durante el muestreo y el análisis.

Objetivos de la investigación

El objetivo de la investigación es determinar la "causa raíz" de un MDD. La investigación debe ser siempre realizada, aun cuando de antemano ya se haya decidido que el lote de producto será rechazado. La investigación tiene como objeto establecer la fuente de la desviación y tomar acciones correctivas y preventivas para de esa manera prevenir la repetición de ese resultado. Además se debe determinar si el resultado está asociado a otros lotes del mismo producto o a otros productos.

La investigación de un MDD es necesaria entonces para:

- conocer la "causa raíz" responsable del resultado,
- tomar acciones correctivas y preventivas (*Corrective and Preventive Actions* o CAPA), y
- demostrar que las acciones tomadas fueron efectivas.

La consecuencia de una investigación adecuada y de la correcta toma de acciones será un aumento en la calidad del trabajo del laboratorio, con resultados más confiables, menor cantidad de MDDs, y como consecuencia de ello, menor costo por resiembras y remuestreos, o por rechazo de materiales; y además menor tiempo de retención de lotes a causa de investigaciones.

Para que la investigación tenga sentido debe ser finalizada en un tiempo razonable, sin preconceptos, bien documentada y con fundamento científico [(2)].

Criterios de aceptación

Ensayos de recuento:

De acuerdo con la armonización entre las farmacopeas de Estados Unidos de Norteamérica (USP), de los países de la Unión Europea (Eur. Ph) y de Japón (JP), y también reproducido en la Disposición 7667/10 de ANMAT en Argentina, se estableció un criterio de aceptación de los recuentos, por el cual "los resultados deben interpretarse como:

- 10^1 UFC (Unidades formadoras de colonias) significa que el recuento máximo aceptado es 20.
- 10^2 UFC significa que el recuento máximo aceptado es 200.
- 10^3 UFC significa que el recuento máximo aceptado es 2000. [(4)]

Veamos cuál es el significado de esta interpretación.

Tomemos por ejemplo el segundo criterio: matemáticamente 1 x 10^2 es igual que 100, pero la diferencia está en las cifras significativas, que es una (1) en el primer caso y tres (100) en el segundo caso; y por ende la diferencia es el error en el recuento. En 1 x10^2 al estar en la cifra 1 el error, el recuento de hasta 200 UFC está aceptado. Hay que tener en cuenta que, si bien el criterio de aceptación se expresa con exponencial, el recuento obtenido después de la lectura debe ser expresado con números naturales.

Este criterio flexible se debe a que el "analito" no es una sustancia química, sino microorganismos vivos, que se caracterizan por:

- su inherente variabilidad biológica,
- los microorganismos pueden estar dispuestos aislados, o en pares, o tetradas, o cadenas, o racimos, u otras formas de agregación, pero por los métodos tradicionales de recuento en placa forman una única colonia o unidad formadora de colonia (UFC), lo que podría llevar a distintos resultados dependiendo de la muestra y su tratamiento.
- los microorganismos no forman soluciones verdaderas en los productos, y
- como ya se expresó anteriormente, en términos generales la contaminación microbiana no está homogéneamente distribuida ni en el producto ni en la muestra.

Por lo general los recuentos de los productos farmacéuticos no estériles son menores que el límite de cuantificación o de detección debido a los cuidados extremos que se toman en este tipo de industrias, y no es frecuente que los recuentos superen los límites de aceptación, por eso una buena práctica sería dejar de lado el citado criterio de aceptación flexible al menos hasta que la investigación haya finalizado, y de esa forma tratar al resultado como un MDD, y sólo concluida la investigación, y con ayuda de este criterio de aceptación flexible, tomar la decisión correcta de liberar o de rechazar el lote de producto.

Ensayos de investigación de microorganismos específicos y objetables:

A pesar de que las farmacopeas indican qué microorganismos deben estar ausentes de acuerdo a la vía de administración del producto, es necesario incluir otros microorganismos que deben estar ausentes en base al tipo de pacientes o su condición de salud, o a cambios o deterioro en las propiedades del producto, o si los microorganismos hallados son considerados patógenos. Estos microorganismos que no están especificados pero que no deben estar presentes son denominados "microorganismos objetables" y su presencia debe ser considerada como un MDD y por lo tanto requiere ser investigada.

Monitoreo ambiental y análisis microbiológico de aguas:

Tanto para monitoreo ambiental como para recuentos de aguas deben establecerse límites de alerta y de acción, y dependiendo del uso del agua y del ambiente, ciertos microorganismos deben estar ausentes, por ejemplo Gram negativos en un ambiente limpio, o *Pseudomonas* y *E. coli* en aguas que se utilizan para elaborar ciertos productos acuosos de administración oral, especialmente los antiácidos.

Hay que tener en cuenta que un MDD en monitoreo ambiental o en aguas, no implica necesariamente un rechazo del producto elaborado.

Procedimiento general de una investigación

El proceso para realizar una investigación de un MDD debe estar previamente detallado en un Procedimiento Operativo Estándar (POE o SOP), y debe ser documentada formalmente. Primeramente se realiza la investigación en el laboratorio para determinar si se trata de un error de análisis; y luego, si no se encuentra la causa allí, la investigación debe ser continuada fuera del laboratorio.

INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA:

Un MDD puede ocurrir por un error en el análisis, lo que incluye error del analista, o por las condiciones del ensayo o de las instalaciones del laboratorio, pero también puede ser que el producto realmente está contaminado. En todos esos casos cuando un resultado que no cumple es detectado, la supervisión del laboratorio debe ser notificada de inmediato.

Una diferencia entre las investigaciones de ensayos químicos y microbiológicos es que los materiales (matraces, pipetas y otros) y la muestra misma usada en los ensayos químicos, por lo general pueden ser retenidos hasta que se obtengan los resultados, tal como lo pide la guía de OOS de la FDA, para que en caso de ser necesario

sea posible repetir el análisis a partir de la misma solución y con el mismo material volumétrico. Sin embargo cuando se efectúan análisis microbiológicos por métodos tradicionales, los resultados tardan varios días en ser obtenidos y el material no puede retenerse, porque la cantidad y la proporción de microorganismos en la muestra no va a ser la misma a lo largo del tiempo, ya que pueden perder viabilidad si la muestra tiene propiedades antimicrobianas, o por el contrario pueden multiplicarse cuando la actividad acuosa es suficiente y la muestra no inhibe el desarrollo de ese contaminante.

Se debe tener en cuenta además que las muestras de control ambiental y de sistemas de aguas son "irrepetibles", ya que son sistemas que varían constantemente, y en los que un resultado de un análisis refleja sólo lo que ocurrió en el momento del muestreo.

Responsabilidad del analista:

Los análisis microbianos efectuados por métodos tradicionales son extremadamente dependientes del operador. El analista debe ser entrenado para que conozca cuáles son los potenciales problemas que pueden ocurrir durante el análisis, y cuáles son las prácticas en el laboratorio que pueden ocasionar un resultado incorrecto. Por ese motivo los analistas de microbiología deben tener un nivel de educación, entrenamiento y experiencia que les permita efectuar los ensayos adecuadamente.

El analista también debe asegurarse que el método empleado está validado y vigente, que los medios de cultivo cumplen con el Ensayo de Promoción del Crecimiento (*Growth Promotion Test*), y que los materiales están estériles.

Si durante el análisis ocurre un error obvio, el analista debe inmediatamente documentar el evento y no debe continuar con el análisis hasta que la situación haya sido corregida. Si el analista detectara un error y continuara el análisis "a riesgo", los resultados serían confusos y no confiables.

Los siguientes son ejemplos de errores:

- manipuleo incorrecto de la muestra,
- materiales no adecuadamente esterilizados o desinfectados que pueden causar contaminación durante el ensayo,
- daño en el envase de la muestra,
- apariencia sospechosa del envase o de la muestra,
- apariencia de los medios de cultivo o de las soluciones diluyentes,
- problemas con el ambiente/ flujo laminar/ filtros HEPA, presiones diferenciales, durante el ensayo,
- equipamiento fuera de calibración

Responsabilidad del supervisor:

Es fundamental que el analista comunique inmediatamente a la supervisión cuando detecta un MDD.

Los microbiólogos con responsabilidad de supervisión deben tener un nivel apropiado de educación académica, y para investigar los MDD deben estar previamente entrenados. Antes de la investigación debe asegurarse que no ocurrió error de transcripción o de cálculo, que los factores de dilución están correctamente aplicados, que los ensayos de identificación hayan sido interpretados correctamente, o que no hubo algún otro error que pueda invalidar el resultado obtenido. Es importante que el supervisor sea objetivo durante la investigación, y que ésta se realice en el menor tiempo posible.

Las responsabilidades del supervisor incluyen:

- Discutir con el analista el método que empleó, y confirmar que éste sabe efectuar correctamente el ensayo. Puede ser necesario una verificación visual de la forma de manipuleo aséptico o la forma de vestirse para ingresar al área de control, sobre todo si el contaminante es de origen ambiental o si su *habitat* normal es la piel del cuerpo humano. En ese caso revisar los resultados de los controles ambientales. Tener en cuenta que los microorganismos que están en el área de control también pueden estar en las áreas de producción.

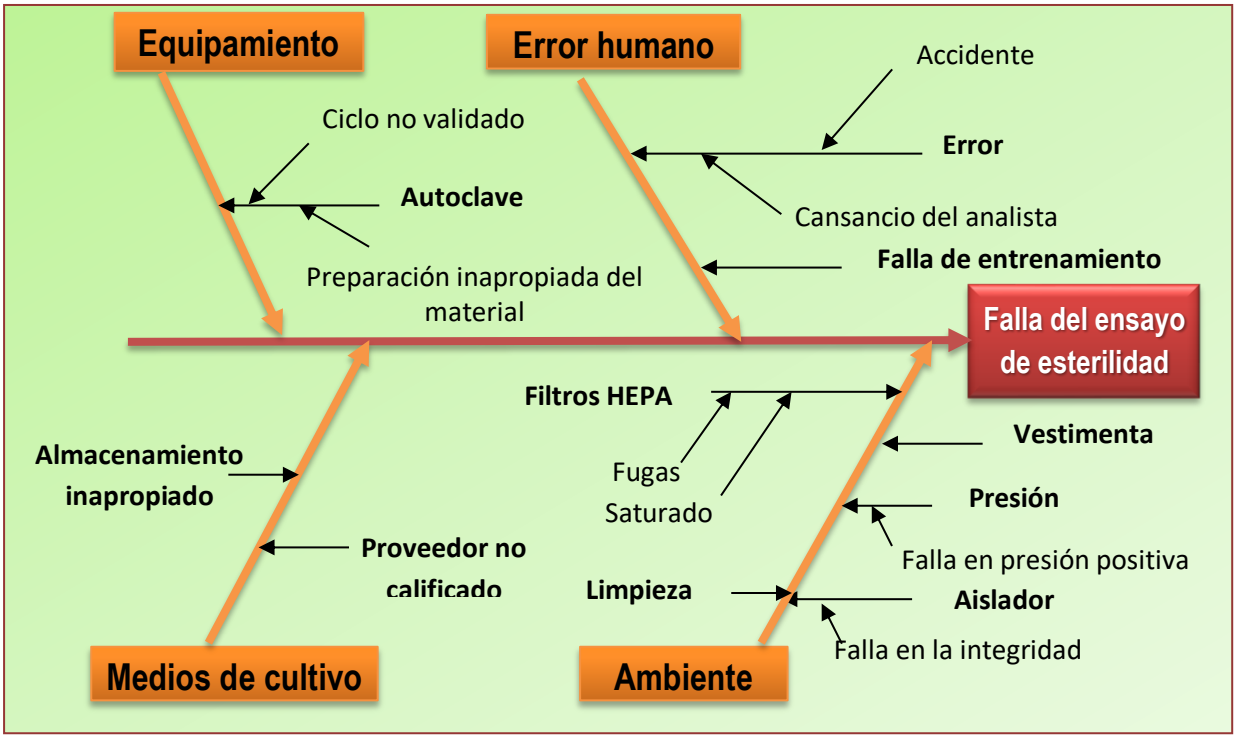
- Confirmar que los medios de cultivo y los materiales utilizados hayan estado adecuadamente esterilizados. Revisar los registros de esterilización, el estado de calificación de los esterilizadores, el resultado de los controles negativos y los resultados de la preincubación de medios de cultivo.
- Confirmar que se utilizaron los medios de cultivo apropiados y previamente controlados y aprobados.
- Chequear los resultados históricos, los reportes de MDDs ocurridos en el pasado, las investigaciones realizadas y las acciones tomadas.
- Retener la documentación del lote para su revisión en busca de probables situaciones que causaron el evento.

Es conveniente diseñar un *check-list* con preguntas acerca de todos los posibles motivos por los que puede ocurrir un MDD para cada tipo de ensayos. Para establecer este tipo de preguntas lo ideal es discutir sobre las posibles causas entre todos los integrantes del laboratorio, y utilizar herramientas como por ejemplo diagramas de espina de pescado o *brainstorming*. Ver el ejemplo de la Figura 1 donde se muestra un diagrama de espina de pescado para ensayos de esterilidad.

Los errores en el laboratorio deberían ser relativamente raros. La existencia de errores frecuentes sugiere que los analistas no están debidamente entrenados, o que las condiciones edilicias de diseño o de limpieza y desinfección no son las adecuadas, o que los equipos no están adecuadamente mantenidos o calificados, o que el trabajo en el sector no es cuidadoso.

Cuando existe clara evidencia de error en el laboratorio, deben tomarse acciones correctivas y/o preventivas, el resultado debe invalidarse, y debe conducirse nuevamente el análisis. La investigación debe ser adecuadamente documentada.

Figura 1: *Algunos de las causas más probables de fallas de ensayos de esterilidad*



INVESTIGACIÓN FUERA DEL LABORATORIO (*Full-scale*):

Cuando la causa del MDD no pudo ser hallada en el laboratorio, debe efectuarse una investigación a mayor escala que puede consistir en una revisión del proceso de elaboración, reanálisis de materias primas utilizadas o de los materiales de envase primarios, verificación de los resultados del análisis microbiológico del agua que se utilizó en la elaboración o en el lavado de los equipos, verificación de la limpieza del equipamiento, datos de validación o calibración, resultados de controles ambientales, cambios de personal, puntos críticos de un proceso, etc.

El objetivo de la investigación es identificar la causa raíz del resultado fuera del límite y tomar las acciones correctivas y/o preventivas necesarias para evitar la repetición del resultado. Toda la investigación debe ser adecuadamente documentada. Puede ser necesario investigar lotes anteriores del mismo producto, o de otros productos elaborados o en las mismas condiciones o con los mismos materiales o equipos si se sospecha de ellos.

Toda acción tomada debe ser descripta en el documento, y si el resultado fuera del nivel de aceptación es confirmado, el producto debe ser rechazado.

Pueden efectuarse ensayos adicionales tales como:

1. Análisis de las materias primas o de los materiales de envase primarios del contenedor en uso, si se sospecha de inhomogeneidad de la contaminación entre los distintos contenedores, o de contaminación por sucesivas aperturas y fraccionamientos a partir de un mismo contenedor.
2. Análisis de pasos intermedios durante la producción, ya que a veces puede ayudar a la identificación del paso en que el producto adquirió la contaminación.
3. Reanálisis: se realiza sobre una porción de la muestra original, o de una muestra retirada en el mismo momento y de la misma manera que la muestra original. Tener en cuenta que:
    - La decisión de efectuar el reanálisis debe estar justificada.
    - Si el MDD ocurrió por ausencia de esterilidad o presencia de microorganismos objetables o específicos, el resultado de un reanálisis no debe ser utilizado para aprobar el material, por la baja probabilidad de repetición del resultado debido a que en esos casos la contaminación se encuentra en muy bajas concentraciones.
    - Si el MDD fue por un alto recuento, el reanálisis puede ser útil debido a que en general, si bien puede no repetirse el valor numérico, sí se repite un alto conteo, lo que ayuda a confirmar el resultado.
    - Si se realiza el reanálisis de un recuento, puede ser necesario realizar más diluciones que permitan hacer que el recuento sea más confiable. Si el reanálisis es por presencia de microorganismos específicos u objetables en 10 gramos, conviene utilizar no menos de 30 gramos en 3 muestras de 10 gramos cada una, para no cambiar el procedimiento validado.
    - Cuando se evalúa el resultado de un reanálisis es importante tener en cuenta que la contaminación en general varía a lo largo del tiempo dependiendo de las características del producto como su actividad acuosa (a_w), presencia de sustancias que inhiben el desarrollo microbiano, o las condiciones de almacenamiento.
4. Remuestreo: El remuestreo puede ser realizado cuando hay sospechas sobre el procedimiento de muestreo, y en ese caso el remuestreo se realiza de la misma manera que el muestreo original. Si se sospecha inhomogeneidad de la contaminación, el remuestreo puede estar centrado en una parte del lote, como en el caso de líquidos o cremas no estériles, en los que se sospecha que la contaminación está exclusivamente en las primeras unidades elaboradas en que la causa puede ser deficiencia en la limpieza de la llenadora.
5. Monitoreo ambiental adicional: Por ejemplo hisopados de equipos u otras superficies pueden ayudar a la investigación de las causas de la contaminación
6. Identificación del microorganismo contaminante: Es necesaria para determinar su *habitat* y la posibilidad de inhibición o de desarrollo en la muestra o en el ambiente, o para contribuir a la búsqueda de la fuente de contaminación, por ejemplo, cuando el contaminante pertenece al género *Pseudomonas* la causa de la contaminación debe buscarse en el agua que se usó como materia prima, o para lavar equipos, o en equipos que pudieron haber quedado húmedos luego de la limpieza.

Cuando se efectúan ensayos adicionales es necesario tener en cuenta lo siguiente:

- Los microorganismos pueden variar a través del tiempo en la muestra, en el ambiente y en los sistemas de aguas,
- Puede ser necesario un mayor tiempo de incubación que el indicado en el método tradicional,

- Cuando se pierde tiempo durante la investigación, también se pierden evidencias y la investigación se hace más dificultosa.

En general después de una investigación, y si la causa del MDD no es atribuible a un error de laboratorio, los ensayos adicionales como reanálisis, remuestreo u otros deben estar claramente justificados y detallados, indicando el procedimiento utilizado. Se debe tener en cuenta que las investigaciones inconclusas son frecuentes en Microbiología, especialmente cuando se trata de excursiones de monitoreos microbiológicos ambientales y de aguas.

Una vez que la investigación está completa, normalmente es revisada y aprobada por el departamento de Calidad.

Un ejemplo

Para ayudar a la comprensión, se detalla a continuación un ejemplo hipotético de la investigación de una contaminación en un producto intermedio:

Reporte: Desviación de los Resultados Microbiológicos (MDD)

Fecha: 10/08/2009	**Analista:** PK	**MDD**
Producto: Comprimidos XX	**Lotes:** 18790-18791-18792-18793	**#** MI020

Descripción del MDD:
El recuento de hongos no cumple (Especificación: No más de 10^2 UFC/g).
Detalle del recuento obtenido en cada lote:

Lote 18790: Recuento de hongos = 100 UFC/g - # análisis R2817
Lote 18791: Recuento de hongos = 230 UFC/g - # análisis R2820
Lote 18792: Recuento de hongos = 170 UFC/g - # análisis R2821
Lote 18793: Recuento de hongos = 550 UFC/g - # análisis R2828

Todas las colonias pertenecen a un único contaminante. Resultado de la identificación: *Aspergillus sp.*

Observaciones:

- El factor de dilución utilizado para obtener estos recuentos por volcado en placa fue 1:20, por lo que el valor real de recuento en cada placa, excepto para el último lote, es menos de 25 UFC.
- Si bien el primer lote cumple con el requerimiento, hay una evidente relación con los lotes siguientes, que pertenecen a la misma campaña, por lo cual ningún lote puede ser aprobado hasta finalizada la investigación.

INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO:

Investigación preliminar – *Check list*

Fue utilizado el método vigente?	Sí
Fue seguido exactamente?	Sí
Se detectó alguna tendencia en los recuentos de los últimos lotes?	No
Se efectuó el control negativo? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
Se realizaron otros ensayos en paralelo? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
Los registros de esterilización cumplen los parámetros establecidos?	Sí
Se chequearon los ciclos con indicadores biológicos? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
Fue realizado el control de calidad de los medios de cultivo? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
El analista chequeó visualmente el estado de los medios de cultivo? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
Cambió la marca o el proveedor del medio de cultivo?	No
En envoltorio de las placas y de las pipetas estaban intactos?	Sí
Los cálculos se efectuaron con el factor de dilución correcto?	Sí

Se efectuó el monitoreo del aire y superficies? Cuál fue el resultado?	Sí/OK
Existió algún inconveniente durante el análisis?. Si es SI, explicar al dorso?	No
La muestra fue tomada por un técnico entrenado?	Sí
Las condiciones de envío de la muestra cumple con el procedimiento escrito vigente?	N/A
La muestra fue condicionada de acuerdo con el procedimiento vigente?	Sí
El analista estaba entrenado para efectuar el ensayo?	Sí
Ocurrió este MDD en el pasado? Si es SI aclarar el número de reporte? Reporte Nº: N/A	No
Analista: PK Fecha 10/08/2009 Supervisor: SI Fecha: 10/08/2009	

Reanálisis:

Justificación del reanálisis: Según se señaló en la descripción del MDD, los recuentos tienen error mayor por ser bajo el recuento en cada placa (menos de 25 UFC, excepto para el último lote). El objetivo del reanálisis es obtener un valor más preciso, más aun teniendo en cuenta que según las farmacopeas el criterio de aceptación es 2 x 10^2 UFC/g.
No se pudo validar una técnica con dilución 1:10 ya que la placa presenta una opacidad que no permite el recuento. Por esa razón el reanálisis tuvo que ser realizado utilizando nuevamente la dilución 1:20, pero el ensayo fue realizado por triplicado en vez de duplicado para cada recuento.
Las muestras para el reanálisis fueron tomadas en paralelo con las muestras del análisis original.

Resultados obtenidos en los reanálisis:

Lote 18790: Recuento de hongos = 105 UFC/g - # análisis R2830
Lote 18791: Recuento de hongos = 230 UFC/g - # análisis R2831
Lote 18792: Recuento de hongos = 200 UFC/g - # análisis R2832
Lote 18793: Recuento de hongos = 300 UFC/g - # análisis R2833

Resultados de la investigación en el laboratorio:

- Sólo los lotes 18791 y 18792 fueron muestreados y analizados el mismo día.
- Las 4 muestras se tomaron en diferentes momentos.
- Dos analistas efectuaron los 4 análisis.
- El lote 18793 fue analizado en la cabina de bioseguridad #2, mientras que el resto se analizó en la #1.

Conclusión: Estas observaciones junto al check list demuestran que el muestreo y el análisis no son la causa de MDD.

Acciones correctivas en el laboratorio de Microbiología: N/A

La causa de la contaminación no es asignable al Laboratorio de Microbiología.
Se hará una investigación *full-scale* en Producción.

Jefe de Microbiología: ML Fecha 14/08/2009 Gcia. de G. de Calidad: NX Date: 14/08/2009

INVESTIGACIÓN *FULL-SCALE*:

Revisión del batch record y otros documentos:

- Todos los pasos de la elaboración fueron realizados de acuerdo al *batch record* y a los procedimientos escritos.
- Todas las materias primas fueron analizadas al ingreso, y cumplían con todos los requerimientos microbiológicos.
- El agua purificada utilizada en el lavado de los equipos fue analizada y cumplía con los requerimientos microbiológicos.
- Se usó agua como ingrediente, ya que el producto se realiza tras una granulación húmeda y posterior secado.
- Los SOPs de limpieza de los equipos están de acuerdo al procedimiento validado y no se realizaron cambios.
- Los operadores siguen exactamente las indicaciones de los SOPs.
- Los operadores fueron entrenados para efectuar las tareas de limpieza de equipos.

- El monitoreo de las áreas de comprimidos se efectúa mensualmente. La semana anterior a la fabricación de los lotes contaminados fueron monitoreadas y los resultados cumplían con los límites de acción y de alerta. No se detectó desarrollo de hongos.
- Los 4 lotes fueron elaborados en la misma campaña los días 3, 5, 6 y 7 de agosto (lunes, miércoles, jueves y viernes).
- Durante la campaña sólo se efectuaban limpiezas menores en algunas partes de los equipos.
- Según el SOP la limpieza profunda se realiza los fines de semana, pero no especifica qué se hace los días feriados o no laborables. El 4 de agosto no fue laborable.

Ensayo adicional - **Hisopados de equipos de producción:**

Objetivo del ensayo: detectar presencia de hongos en los equipos.

Resultado: En el momento del muestreo los únicos equipos que no habían sido lavados eran el mezclador y la granuladora. Se detectó presencia de hongos a simple vista en ambos equipos.
En los equipos que habían sido limpiados no se halló presencia de hongos en las muestras de los hisopados.
Se tomó muestra de la canilla de agua purificada que se encuentra en el cuarto de granulación.
Se tomaron muestras de distintos puntos del cuarto y exterior de los equipos con Placas Rodac.
Se tomaron muestras del interior de los equipos no lavados con hisopos.
En todas estas muestras se buscó y se detectó presencia de hongos *Aspergillus sp*

Conclusión:

Las fechas de elaboración, los recuentos obtenidos y los ensayos adicionales sugieren que:

- El primer lote tenía 100 UFC/g (cumple).
- Como los equipos no fueron lavados y el granulado que quedó remanente en la granuladora y molino eran húmedos los hongos pudieron desarrollar hasta que el segundo lote fue elaborado, por lo que este lote tuvo mayor recuento que el primero.
- El recuento permaneció en el mismo orden o se incrementó levemente en los lotes siguientes.

La MDD fue confirmada: SI Reporte CAPA #: 046.09

Jefatura de Microbiología: ML Fecha 19/08/09 Gerencia de QA: NX Fecha: 19/08/09

ACCIONES CORRECTIVAS Y PREVENTIVAS (CAPA):

Acciones correctivas:

- Modificación de los SOPs de limpieza de equipos para dejar más claro en qué situaciones un equipo puede quedar con producto y cuándo se requiere una limpieza profunda durante una campaña.
- Entrenar a los operadores para el cumplimiento de los SOPs.
  Las acciones correctivas fueron tomadas? SI Fecha: 26/08/09

Acción preventiva:

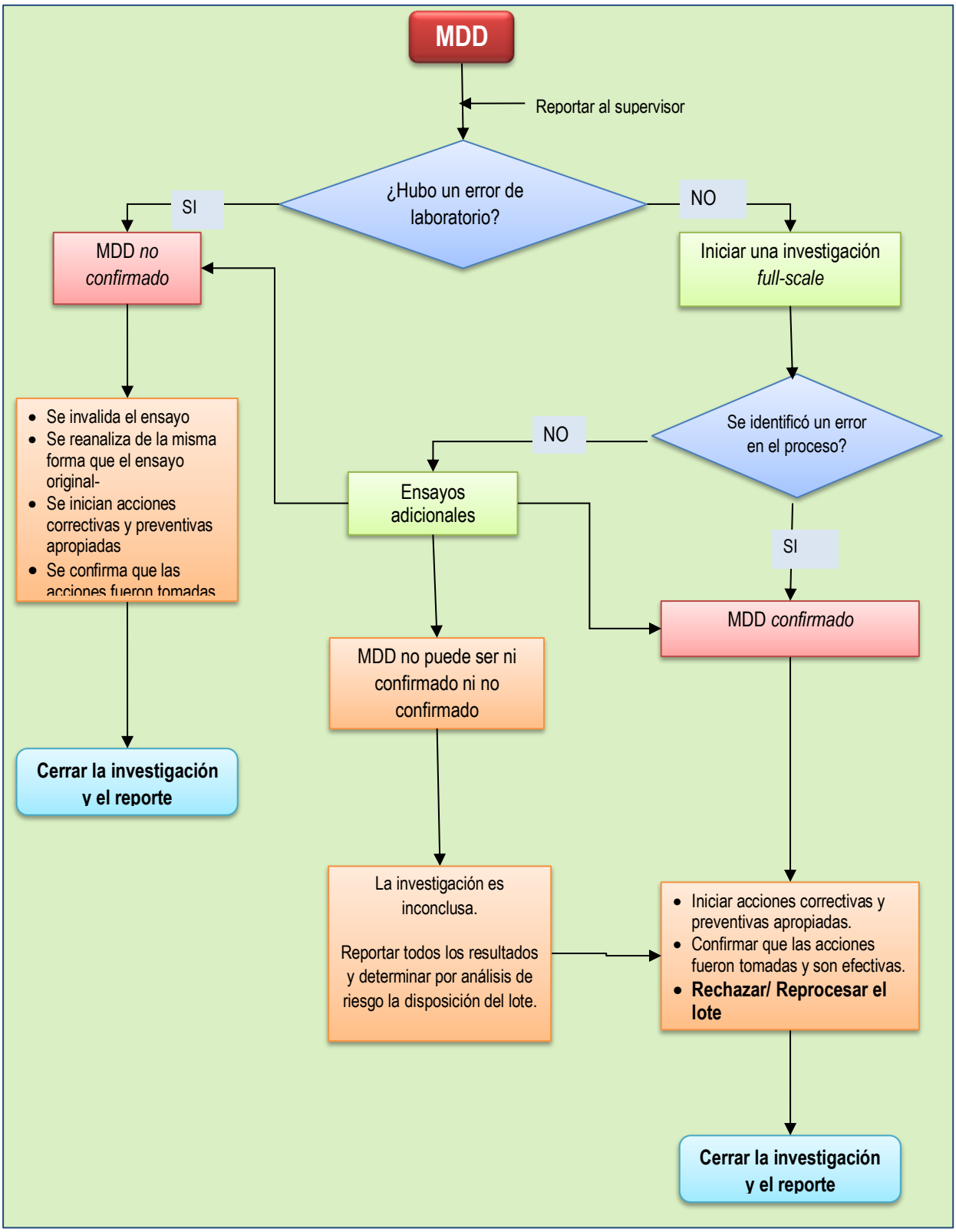
- Limpieza y desinfección de todas las superficies del área de granulación.
  Las acciones correctivas fueron tomadas? SI Fecha: 19/08/09

DECISIÓN FINAL:

Los lotes 108790, 108791, 108792 y 108793 son RECHAZADOS.

Jefatura de Microbiología: ML Fecha: 24/08/09
Jefatura de Producción de Comprimidos: XY Fecha: 24/08/09
Gerencia de Producción: EZ Fecha: 24/08/09
Gerencia de QA: NX Fecha: 24/08/09

Figura 2. *Flujo de trabajo*



Conclusiones

Un MDD inicial no necesariamente significa que el producto será rechazado.

Un MDD *no confirmado* significa que el test debe ser invalidado por un error o problema en el laboratorio, en ese caso se debe establecer un plan de acción para corregir el problema y prevenir su repetición. Una vez que el plan ha sido cumplido debe verificarse su eficacia.

Un MDD *confirmado* por lo general indica que el lote no cumple con los criterios establecidos de aceptación y puede generar el rechazo del lote, dependiendo de la evaluación de riesgo. Debe investigarse la fuente de contaminación, y el plan de acción debe ser establecido y llevado a cabo por Producción para corregir el error y prevenir su repetición. En general el seguimiento del cumplimiento es efectuado por el área de Garantía o Aseguramiento de la Calidad. Una vez que el plan ha sido cumplido debe verificarse su eficacia.

Para investigaciones inconclusas – cuando la investigación no revela la causa y el resultado no puede ser ni confirmado ni invalidado - debe tomarse la decisión correcta y justificada de liberar o de rechazar el lote. En el reporte deben estar detallados todos los ensayos adicionales. Si es posible debe establecerse alguna acción correctiva o preventiva como por ejemplo entrenamiento; y su eficacia debe ser verificada.

Las investigaciones deben ser revisadas periódicamente para detectar desviaciones recurrentes. En la Figura 2 se ilustra el flujo de trabajo.

Referencias

1. FDA´s Summary of Judge Wolin´s *Interpretation of GMP Issues Contained in the Court´s Ruling in USA vs Barr Laboratorie*s. 02/04/1993. http://www.gmp1st.com/barrsum.htm

2. FDA Guidance for Industry. *Investigating Out-of-Specifications (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production*. October 2006.

3. US Pharmacopeia <1117> *Microbiological Best Laboratory Practices*.

4. US Pharmacopeia <1111> Mi*crobiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use*

Bibliografía adicional recomendada

Scott Sutton. *Microbiological Data Deviation*. PMF Newsletter Volume 12, Number 11 November 2006.

Lucia Clontz. *Microbial Limit and Bioburden Tests Validation Approaches and Global Requirements*, Second Edition.

Mónica Lagomarsino. *Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical devices*. Chapter 19: *Investigation of Microbiological Data Deviations*. Editors: Madhu Raju Saghee, Tim Sandle and Ed Tidswell. Horizons.

Agradecimientos

Agradezco la dedicación de mis ex-colaboradores del laboratorio de Microbiología de Gador, y el apoyo y paciencia de mi familia, mi esposo Ricardo y mi hija Leonor, a quienes especialmente dedico este capítulo.

Capítulo VI.3.

Microorganismos objetables

Sergio Iglesias

Introducción

Concepto de Microorganismo objetable

Análisis de riesgo

Riesgo microbiológico

Determinación de Microorganismos objetables

Cuándo un microorganismo se considera objetable?.

Conclusión

Bibliografía

INTRODUCCIÓN

En la Microbiología de la Industria Farmacéutica existen 4 clásicos microorganismos indicadores de calidad:

- ✓ ***Escherichia coli***
- ✓ ***Salmonella* spp.**
- ✓ ***Pseudomonas aeruginosa***
- ✓ ***Staphylococcus aureus***

Escherichia coli es la enterobacteria indicadora de una contaminación en el proceso de elaboración de un producto farmacéutico por encontrarse en aguas potables no bien tratadas y/o por contaminación debida a malas prácticas del personal (por ejemplo: la no utilización de guantes, malas prácticas de lavado de manos e higiene), en los distintos procesos de manufactura en que está expuesto el producto y en materias primas de origen natural.

Las bacterias del género *Salmonella* son una familia de bacterias cuya presencia indicaría también un problema debido a la calidad de materias primas de origen natural.

La presencia de *Pseudomomas aeruginosa* estaría indicando un problema en el sistema de producción de agua de calidad farmacéutica de la Planta como en el procedimiento de limpieza, secado y almacenamiento de los equipos de producción.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en un producto puede deberse a un problema en el ambiente de elaboración del producto farmacéutico y/o una mala práctica del personal, ya que este microorganismo es típico de la flora de cabellos y piel del ser humano.

A estos 4 microorganismos se los denomina generalmente “microorganismos específicos o especificados” ya que según la forma farmacéutica son los microorganismos que deben estar ausentes por especificación, según indican las Farmacopeas [1, 2, 3]

CONCEPTO DE MICROORGANISMO OBJETABLE

El concepto de *microorganismo objetable* no aplica a productos estériles ya que ningún microorganismo debe ser incorporado al torrente sanguíneo a través de un producto parenteral o a través de mucosas como en el caso de un producto oftálmico. En estos casos el test de esterilidad es un ensayo diseñado para determinar ausencia de microorganismos en el producto, aunque no baste sólo este ensayo para determinar la inocuidad del producto.

El concepto de *microorganismo objetable* sí aplica a:

- Productos no obligatoriamente estériles.
- Sus ingredientes, tanto principio activo como excipientes.
- Material de envase primario.
- Microorganismos hallados en el sistema de distribución de agua de elaboración y limpieza.
- Microorganismos hallados en áreas de producción y acondicionamiento donde se encuentre producto expuesto.
- Microorganismos hallados durante el desarrollo de la validación de limpieza de los equipos productivos.

La denominación de *microorganismo objetable* es mucho más amplia que el de microorganismo específico, ya que abarca tanto el concepto de microorganismo patógeno, perjudicial para el paciente, como el concepto de microorganismo perjudicial para el producto.

El Código 21 de Regulaciones Federales de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos [4] determina que cada lote de un componente, droga, contenedor del producto o cierre que sea susceptible de contaminación microbiana *objetable,* de acuerdo a su uso previsto, deberá ser sujeto a controles microbiológicos antes de su uso [5]. También indica que deben existir procedimientos escritos apropiados para prevenir la presencia de *microorganismos objetables* en los productos que no sean estériles [6] y procedimientos adecuados para testear cada lote de producto terminado para determinar en ellos la ausencia de *microorganismos objetables* [7].

Nuestra agencia regulatoria (ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) especifica que "En caso de detectarse microorganismos no especificados se deberá evaluar su relevancia en función de: vía de administración, naturaleza del producto y pacientes a los cuales está destinado [8].

La Farmacopea de Estados Unidos (USP) determina que además de los microorganismos especificados, la significancia de otros microorganismos recuperados en el producto, deben ser evaluados de acuerdo al uso del producto, la naturaleza del producto, el método de aplicación del producto, a quién está dirigido el producto, por ejemplo, si el producto es inmunosupresor y/o el producto está dirigido a pacientes con órganos dañados, heridas o enfermedades preexistentes [9]. También determina que los productores de medicamentos son responsables de determinar si los microorganismos recuperados de un producto son o no *objetables* [10].

La *Parental Drug Administration* (PDA) publicó un reporte dedicado a la exclusión de *microorganismos objetables* de los productos farmacéuticos, productos médicos y productos cosméticos, donde establece que los *microorganismos objetables* son microorganismo que, ya sea por su presencia o por su crecimiento, pueden ser peligrosos para los usuarios del producto, o microorganismos que pueden degradar o afectar los atributos fisicoquímicos, funcionales o terapéuticos de los productos [11].

ANÁLISIS DE RIESGO

Cada vez que se detecta uno o varios microorganismos no especificados en un producto, debe realizarse un análisis de riesgo para determinar si es considerado objetable.

Este análisis de riesgo debe incluir:

- Atributos del producto.
- Ruta de administración.
- Recuento obtenido de microorganismos (carga microbiana o "*bioburden*" en inglés)
- Cantidad de especies de microorganismos hallados.
- Su potencial patogenicidad.
- Su habilidad para sobrevivir y crecer en el producto.
- Población a la que está dirigido el producto.

Esta es la razón por la que no es posible construir o publicar un listado de "*Microorganismos objetables*" ya que, por un lado dependerá en cada caso de la conclusión que se obtenga del análisis de riesgo, que deberá considerar cada uno de los factores antes mencionados, y además la lista sería muy larga ya que hay muchos microorganismos existentes que podrían ser considerados objetables.

El control microbiológico de un producto no obligatoriamente estéril deberá entonces evaluar:

- El recuento de microorganismos.
- El análisis de ausencia de microorganismos específicos.
- El análisis de ausencia de *microorganismos objetables*

RIESGO MICROBIOLÓGICO

El riesgo microbiológico de un microorganismo hallado en un producto debe evaluarse de acuerdo a los siguientes factores:

- Los atributos del producto
- Forma de administración del producto.
- Actividad acuosa del producto. (a_w)

De acuerdo con los atributos del producto se deberán considerar y evaluar:

- La forma farmacéutica: si el producto es un líquido acuoso, una crema, un producto de base oleosa, un comprimido o una cápsula.
- Propiedades antimicrobianas del principio activo.
- Tipo y características de los excipientes que contiene.
- Presencia de conservantes en la formulación.

De acuerdo con la forma de administración del producto se deberán considerar y evaluar el riesgo, el cual en orden decreciente es el siguiente:

- Aerosoles y polvos de inhalación.
- Sprays nasales.
- Productos óticos.
- Supositorios vaginales, productos de base oleosa y cremas íntimas.
- Lociones, geles, cremas y parches tópicos.
- Productos orales líquidos acuosos.
- Productos orales líquidos no acuosos.
- Supositorios y cremas rectales.
- Cápsulas orales con contenido de soluciones o suspensiones.
- Comprimidos y cápsulas duras orales.

De acuerdo con la actividad acuosa del producto [12] se deberá evaluar la posibilidad de desarrollo de los microorganismos en el producto durante la vida útil del mismo.

En la Tabla 1 se describe el mínimo a_w que debe tener un producto para permitir el desarrollo microbiano, por debajo del a_w indicado para cada microorganismo, éste puede permanecer latente o perder viabilidad, pero no desarrollarse (no puede multiplicarse ni generar toxinas)

Tabla 1

Microorganismo	Mínima a_w para desarrollo
Pseudomonas aeruginosa *Clostridium botulinum*, Type E	0.97
Bacillus cereus *Clostridium botulinum*, Type A, B *Escherichia coli* *Salmonella spp.* *Clostridium perfringens* *Burkholderia cepacia* *Klebsiella* *Lactobacillus viridescens* *Pseudomonas aeruginosa*	0.95
Enterobacter aerogenes *Pseudomonas fluorescens*	0.94
Micrococcus lysodekticus *Rhyzopus nigricans*	0.93
Listeria monocytogenes *Mucor plumbeus* *Rhodotorula mucilaninosa*	0.92
Serratia marcesens *Plesiomonas shigelloides* *Shigella spp.* *Vibrio cholerae* *Vibrio parahaemolyticus* *Yersina enterocolitica* *Yersina pseudotuberculosis* *Aeromonas caviae* *Aeromonas hydrophilia* *Aeromonas sobria*	0.91
Bacillus subtilis *Staphylococcus aureus* (anaeróbico) *Saccharomyces cerevisiae*	0.90
Candida	0.88
Staphylococcus aureus (aeróbico)	0.87
Paecilomyces variotti	0.84
Penicillium chrysogenum	0.83
Aspergillus fumigatus	0.82
Penicillium glabrum	0.81
Aspergillus flavus	0.78
Aspergillus brasiliensis	0.77
Halobacterium halobium	0.75
Zygosachharomyces rouxii	0.62
Xeromyces bisporus	0.61
No hay proliferación microbiana	**<0.60**

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETABLES

Dependiendo de las características y la evaluación según el análisis de riesgo del producto podemos clasificar a los productos en 3 categorías:

- **Productos de bajo riesgo:** Comprimidos, cápsulas y líquidos orales. Líquidos y supositorios rectales.
- **Productos de riesgo moderado**: Lociones, productos de base oleosa y cremas tópicas. Supositorios vaginales.

- **Productos de alto riesgo:** Productos para los ojos, sprays nasales, productos por inhalación, lociones tópicas y cremas aplicadas a piel dañada o alrededor de los ojos.

En los productos de **bajo riesgo** se deberá investigar:

Recuento microbiano [1,3,14]: Identificar las colonias desarrolladas sólo si el recuento alcanza el límite de la especificación o si el recuento es elevado.

Microorganismos específicos [1,2,15]: Identificar las colonias típicas y no típicas en los medios selectivos y diferenciales utilizados.

En los productos de **riesgo moderado** se deberá investigar:

Recuento microbiano [1,3,14]: Identificar todas las especies si el recuento supera el "límite de alerta" establecido.

Microorganismos específicos [1,2,15]: Luego del enriquecimiento en TSB (Caldo Tripticasa Soya), efectuar un pasaje no sólo a los medios selectivos indicados en las farmacopeas, sino también a TSA (Agar Tripticasa Soya) e identificar de todos los tipos de colonias encontradas.

En los productos de **alto riesgo** se deberá investigar:

Recuento microbiano [1, 3, 14]: Identificar todos los tipos de colonias recuperadas.

Microorganismos específicos [1,2,15]: Luego del enriquecimiento en TSB efectuar pasajes no sólo a los medios selectivos indicados en farmacopeas y a TSA, sino también a Agar Sangre u otros medios de enriquecimiento no selectivos e identificar todos los tipos de colonias encontradas**.**

La evaluación de riesgo debe ser un trabajo interdisciplinario que debe llevarse a cabo como mínimo con el Departamento Médico y el Departamento de Garantía de Calidad. Se pueden definir distintos niveles de riesgo, de acuerdo a la población a la que se destina el producto, donde 1 es el de mayor riesgo. Una posible clasificación podría ser la siguiente:

Nivel 1: citostáticos, productos para transplantes y antirretrovirales.

Nivel 2: corticoesteroides e inmunosupresores.

Nivel 3: productos para diabéticos (propensos a infecciones)

Nivel 4: poblaciones vulnerables (ancianos y niños)

Nivel 5: Los productos destinados a la población general, sin patologías preexistentes se podrían considerar de bajo riesgo, pero debe igualmente realizarse el análisis de riesgo correspondiente.

¿CUÁNDO UN MICROORGANISMO SE CONSIDERA OBJETABLE?:

- Cuando es patógeno y puede causar una enfermedad.
- Cuando la ruta de infección es la misma ruta de administración del medicamento.
- Cuando el recuento excede un límite. (ejemplo: 100 UFC/ g de Enterobacterias)
- Cuando está descripto en el "*Bad Bug Book*" [16] de descarga gratuita de la página oficial de la FDA.

- Cuando el microorganismo hallado se encuentra descripto en sucesivos retiros del mercado. (consultar a la FDA [17], reportes de autoridades sanitarias nacionales e internacionales, publicaciones científicas, centros de control y prevención de enfermedades, reportes e informes de la PDA, etc.)
- Cuando el microorganismo hallado está asociado a patologías o enfermedades para una población de pacientes para las que el medicamento está indicado:
  - Recién nacidos o bebés.
  - Personas enfermas y/o inmunosuprimidas.
  - Ancianos.
  - Tratamientos crónicos.

Es importante resaltar que "No todo microorganismo objetable es patógeno". Un microorganismo puede ser considerado objetable también en los siguientes casos:

- Un microorganismo "no patógeno en condiciones normales" puede ocasionar problemas a un paciente dependiendo de la vía de administración del producto.
- La presencia de un microorganismo no patógeno puede afectar la estabilidad del producto.
- Si el microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse en el producto puede alterar las características organolépticas del mismo y generar un retiro de mercado. (Esto sucede frecuentemente con la presencia de *Pseudomonas* en productos líquidos no bien preservados)
- Si el microorganismo sólo es patógeno al generar toxinas durante su desarrollo será crítico el determinar si este microorganismo puede desarrollarse en el producto.
- Si el microorganismo fue hallado en una materia prima y el proceso de elaboración del producto permite su desarrollo posterior (por ejemplo en una etapa de granulación húmeda)
- Si el microorganismo es hallado en el envase primario del producto, especialmente en los envases primarios de productos acuosos con un alto a_w.

Toda esta información deberá estar contenida en el análisis de riesgo de cada producto y la clasificación del microorganismo hallado en objetable o no, dependerá fundamentalmente tanto del conocimiento del elaborador del proceso de producción y del conocimiento de la población a la que se destina el producto.

Ejemplos de microorganismos objetables no especificados en productos sólidos orales:

- *Burkholderia cepacia y Pseudomonas fluorescens* en productos para pacientes con fibrosis quística.
- *Cronobacter sakazakii* en productos para bebés e infantes.

Nota: Entre 2004 y 2011, de 142 retiros de mercado en Estados Unidos, 103 fueron por microorganismos objetables. El microorganismo que con más frecuencia se halló fue *Burkholderia cepacia* (36 casos). Este microorganismo cada vez más merece una mayor atención y es cuestionado por varias agencias regulatorias, por lo cual se le dedica un capítulo en este manual:

Es muy importante armar carpetas bibliográficas por cada microorganismo hallado, con toda la información sobre patogenicidad, hábitat natural, a_w de desarrollo, órganos blanco de infección, vía de infección, si es patógeno oportunista en hospitales o en la población en general. Esto evitará búsquedas bibliográficas reiteradas.

Por otra parte, es muy importante también armar carpetas por cada microorganismo hallado (objetable o no), describiendo en qué productos fue hallado y poder relacionar el microorganismo con distintos productos indicando

que ese microorganismo podría encontrarse en un excipiente común o en un equipo con el que comparten el tren de elaboración.

Si sistemáticamente se detectan en varios productos provenientes de una misma planta bacilos gram positivos esporulados, esto podría estar indicando que los sanitizantes de las áreas de elaboración no son realmente esporicidas, o que no se está utilizando la concentración correcta de los desinfectantes, o que el tiempo de contacto del desinfectante es insuficiente, o que es necesario el reentrenamiento del personal de limpieza.

CONCLUSIONES:

Este capítulo de la microbiología moderna abre un muy interesante e importante rol del laboratorio de control microbiológico en el monitoreo y control del proceso productivo y en la liberación de producto terminado. Enriqueciendo al sector con bibliografía, desarrollo de técnicas y procesos para la identificación y clasificación en nivel de riesgo de los microorganismos encontrados. El microbiólogo deberá trabajar con Ingeniería y los sectores productivos, así como los proveedores de insumos productivos, para asegurar la ausencia o mitigar la presencia de microorganismos objetables en el proceso productivo y en el producto final.

El elaborador deberá asegurar y asegurarse la calidad e inocuidad microbiológica de sus productos ya que la tendencia, tanto desde el punto de vista del paciente como de buenas prácticas de elaboración es obtener productos “libres de microorganismos” o “con una mínima carga microbiana”.

BIBLIOGRAFÍA

1. FARMACOPEA ARGENTINA : Capítulo 90.
2. USP <62> MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS.
3. Ph. Eur. Chapter 2.6.13 MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS
4. CODE OF FEDERAL REGULATIONS (CFR) 21 PART 210 & 211: cGMP IN MANUFACTURING, PROCESSING, PACKING OR HOLDING OF DRUGS AND FINISHED PHARMACEUTICALS.
5. 21 CFR, Part 211.84 “Testing and approval or rejection of components, drug product containers, and closures”
6. 21 CFR, Part 211.113 “Control of microbiological contamination”
7. 21 CFR, Part 211.165 “Testing and release for distribution”
8. ANMAT Disposición 7667 2010 Artículo 2º ANEXO I
9. USP <1111> MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS.
10. USP <1115> BIOBURDEN CONTROL OF NONSTERILE DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS.
11. PDA Technical Report Nº67 “Exclusion of Objectionable Microorganisms from Nonsterile Pharmaceuticals, Medical Devices, and Cosmetics”
12. USP <1112> APPLICATION OF WATER ACTIVITY DETERMINATION TO NONSTERILE PHARMACEUTICAL PRODUCTS.
13. PDA Technical Report Nº67: 7.5 “Screening for Objectionable Microorganisms”
14. USP <61> MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS
15. Ph. Eur. Chapter 2.6.12 MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS
16. HANDBOOK OF FOODBORNE PATHOGENIC MICROORGANSMS AND NATURAL TOXINS. Food and Drug Administration (FDA)
17. WARNING LETTERS: https://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/default.htm.

Capítulo VI.4.

El complejo *Burkholderia cepacia*

José Degrossi

Introducción

Historia y taxonomía: la "complejidad" del cBc

Habitats naturales del cBc

Algunas características interesantes del cBc

Los múltiples efectos del cBc

El cBc como patógeno humano

El cBc como contaminante

Metodología para la búsqueda e identificación del cBc en productos farmacéuticos y cosméticos

ANEXO: Composición de medios de cultivo

Bibliografía

Introducción

El complejo *Burkholderia cepacia* (cBc) comprende un conjunto de bacilos gramnegativos no fermentadores, no esporulados y móviles debido a la presencia flagelos polares [1]. Los integrantes del cBc poseen características fenotípicas muy similares, por lo que no pueden ser discriminados por pruebas bioquímicas tradicionales, pero sí por técnicas moleculares.

La taxonomía del cBc es sumamente dinámica, compleja y está en constante revisión. En la actualidad el cBc está compuesto por al menos 20 especies [2].

Los miembros del cBc se hallan ampliamente distribuidos en el ambiente. Sin embargo, a partir de la década del 80 adquirieron relevancia como patógenos oportunistas para el ser humano [3], y se los han relacionado con frecuentes contaminaciones industriales y hospitalarias [4, 5, 6, 7].

A partir de lo mencionado, puede interpretarse al cBc como un problema emergente que posee al menos dos aspectos básicos. Por un lado el microbiológico, representado por la dificultad para la identificación a nivel especie; y por otro el sanitario, en el cual establecer medidas de control para prevenir contaminaciones e infecciones causadas por el cBc representa un verdadero desafío.

En los siguientes párrafos se describirán algunas de las características más importantes del cBc con el fin de acercar un conocimiento general, y se hará hincapié en el rol que poseen como contaminantes de productos industriales.

Parte de los datos expuestos en este capítulo surgieron a partir de investigaciones realizadas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde desde el año 2004 se están estudiando estos microorganismos.

Historia y taxonomía: la "complejidad" del cBc

Burkholderia cepacia fue descrito en 1949 por Walter Burkholder como agente etiológico de la maceración de los bulbos de cebollas [8]. Recibió el nombre de *Pseudomonas cepacia* y también fue mencionado como *Pseudomonas*

kingii y *Pseudomonas multivorans* [3]. En 1992, *P. cepacia* y otras seis especies del género *Pseudomonas* pasan integrar un nuevo género llamado *Burkholderia* [9]. Desde entonces la taxonomía del género cambió considerablemente y hoy en día incluye más de 40 especies, siendo *Burkholderia cepacia* la especie tipo[10].

A mediados de los 90 se señalan importantes diferencias entre cepas de *Burkholderia cepacia* aisladas de diferentes ámbitos, las cuales hacen problemática la correcta identificación del microorganismo [11].

En 1997, mediante estudios taxonómicos polifásicos que incluían análisis fenotípicos y genotípicos, se demostró que *Burkholderia cepacia* no era un único microorganismo sino que estaba formado por diferentes genomovares[12]. Se comienza a hablar del complejo *Burkholderia cepacia,* integrado en ese entonces por cinco genomovares o especies genéticas.

Paulatinamente se agregan nuevos genomovares al complejo [13,14,15]. Dentro de cada genomovar pueden existir cepas que difieren en sus características. Uno en particular, *B. cenocepacia*, está formado por diversos linajes: *B. cenocepacia* A, *B. cenocepacia* B, *B. cenocepacia* C y *B. cenocepacia* D [16,17].

Con el empleo de diversas técnicas, se ha logrado la correcta discriminación entre los distintos genomovares y cada uno de ellos accedió al *status* de especie a las que se les asignó formalmente nombre propio [11].

En los últimos años, el avance y desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de los microorganismos facilitó la reciente definición de nuevas especies y permitió la inclusión de una especie, *B. ubonensis*, sobre la cual no había consenso si pertenecía o no al cBc [2,18].

Actualmente las especies que forman parte del cBc son: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B vietnamensis*, *B. dolosa, B. ambifaria*, *B. pyrrocinia, B. anthina, B. ubonensis, B. arboris, B. seminalis, B. metallica, B. latens, B. diffusa, B. contaminans*, *B. lata, B. psudomultivorans, B. stagnalis* y *B. territorii.*

Genéticamente, las especies del cBc poseen valores de hibridización ADN-ADN de entre 30 y 60%; mientras que con otras especies del género *Burkholderia* son inferiores al 30%; y entre cepas de una misma especie son superiores al 70% [11]. Las especies del cBc poseen alta homología en las secuencias del 16S ribosomal (98 a 100%); y del gen *recA* (94 a 95%) [10].

Habitats naturales del cBc

Los microorganismos del cBc se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, siendo los *habitats* acuáticos y suelos (principalmente asociados a raíces de plantas), los nichos ambientales donde más frecuentemente son hallados [19]. Todos los miembros del cBc, excepto *B. stabilis* que sólo ha sido detectada en ámbitos hospitalarios e industriales [20], fueron hallados en suelos y/o en aguas naturales en todo el mundo[21,22,23].

La ubicuidad de estos microorganismos se debe principalmente a su gran capacidad metabólica y de adaptación a distintos medios; y a la posibilidad de formar biopelículas.

Algunas características interesantes del cBc

Los miembros del cBc presentan características sumamente interesantes que son la causa de los múltiples efectos que estos microorganismos poseen sobre el hombre y el ambiente.

Algunas características comunes a todos los miembros del cBc como el genoma, la capacidad de formar biopelículas y la resistencia a antimicrobianos serán desarrolladas a continuación.

> ***- El genoma del cBc:*** El gran tamaño del genoma (comparado con el de otras especies bacterianas) y la forma en que se encuentra organizado, son características distintivas de los miembros del cBc y constituyen la base de la versatilidad y capacidad de adaptación evidenciada por estos microorganismos[24].
>
> Todas las especies del cBc analizadas poseen entre 6 a 9 Mb y son unos de los de mayor tamaño encontrado en bacterias gramnegativas [25].
>
> La compleja organización del genoma le otorga una importante plasticidad. El mismo está formado por múltiples replicones distribuidos en estructuras (por lo general tres), consideradas cromosomas [26]. En algunas cepas puede aparecer además la presencia de un pequeño plásmido [24]. Otros dos aspectos significativos son la presencia de secuencias de inserción y de múltiples y extensas islas genómicas.

Aproximadamente el 10% del genoma está compuesto por estas islas [27]. El tamaño y contenido de las mismas difieren, aunque todas contienen genes que indican que derivan de elementos móviles como transposones, plásmidos y bacteriófagos [24].
La secuenciación del genoma de una bacteria es una herramienta cada vez más accesible y por ende cada vez más usada. Los genomas obtenidos, ya sean completos o parciales, se suelen depositar en bases de datos de acceso público (GenBank del *National Center for Biotechnology Information* y el ENA del *European Molecular Biology Laboratory*, por ejemplo). Para el caso del cBc existe además una base de datos propia (Burkholderia.com) que cuenta con más de mil genomas del cBc y otras especies del género *Burkholderia* [28].
La mayoría de aislamientos del cBc que han sido objeto de estudios genómicos son de origen clínico, y en segundo lugar se encuentran los microorganismos aislados del medio ambiente. Sin embargo comenzaron a estar disponibles genomas de aislamientos obtenidos de productos contaminados como *B lata* 383 *y B contaminans* FFI28, un aislamiento obtenido de una solución farmacéutica en nuestro país[29].

- Capacidad de formar biopelículas: La capacidad de formar biopelículas difiere según la especie del cBc evaluada. A pesar que la mayoría de los estudios fueron realizados con las primeras especies definidas del cBc[30,31], se asume que todos los miembros del complejo poseen una importante capacidad de formar biopelículas. Esta forma de crecimiento ha sido observada tanto *in vitro* como en ambientes naturales, o en el tracto respiratorio de pacientes infectados, y le otorga a los microorganismos beneficios frente a las adversidades del entorno, como por ejemplo un notable aumento en la resistencia a antibióticos y desinfectantes [31,32,33].

- Resistencia a antimicrobianos: La resistencia de los miembros del cBc está documentada principalmente frente a antibióticos, pero también existen reportes de resistencia frente a los desinfectantes [32,33,34,35]. Por otra parte, la resistencia del cBc a agentes antimicrobianos se ve plasmada en trabajos que reportan contaminaciones con estos microorganismos en desinfectantes [5] y productos con conservadores [4,6,36].
Además de la capacidad de formar biopelículas, descripta anteriormente, estos microorganismos poseen una amplia batería de mecanismos que le otorgan resistencia, aún en estado planctónico. La composición y estructura del lipopolisacárido de la membrana externa le confiere baja permeabilidad a polimixina y aminoglucósidos [37]. También fueron descriptos mecanismos de resistencia a β-lactámicos en algunas cepas [38]. Por otro lado, está estudiada la existencia de una bomba de eflujo en la membrana externa que expulsa activamente cloranfenicol, trimetoprima y quinolonas [37], y la presencia de una enzima dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprima [39].
Si el enunciado de los mecanismos de resistencia no fuera suficiente, además debemos señalar que algunos miembros del cBc poseen la capacidad de utilizar los antimicrobianos (por ejemplo penicilina G) como única fuente de carbono y crecer a expensas de los mismos [34].

- ***La adaptación: más que una cuestión de supervivencia:*** sin duda alguna la versatilidad del cBc se debe a su gran capacidad de adaptación para sobrevivir en diversos medios incluso en aquellos que *a priori* pueden resultar hostiles para el desarrollo microbiano. Un considerable número de trabajos han puesto en evidencia mecanismos genéticos y moleculares involucrados en la adaptación de estas bacterias a variadas condiciones [40,41,42]. Más allá de sorprendernos, lo que se debe resaltar es que muchas veces los mecanismos que le permiten habitar y colonizar un determinado ambiente conllevan un aumento en la virulencia [43]. El ejemplo más evidente es la producción de moléculas de *quorum sensing* que median la formación de biopelículas y la movilidad tipo *swarming* (factores importantes para la colonización), pero que también controlan la producción de proteasas extracelulares, sideróforos y otros compuestos que tienen un rol fundamental en la virulencia del cBc evaluada en diversos modelos[41]. Este aspecto posee un impacto de relevancia en cuanto a las consecuencias clínicas que puede acarrear la presencia de miembros del cBc contaminando un determinado producto. Está demostrado por ejemplo que la adaptación de especies del cBc a determinados conservadores involucra mecanismos moleculares que generan aumento de resistencia a antibióticos como las fluoroquinolonas[44].

Los múltiples efectos del cBc

Dadas las particulares características, se han descripto un gran número de efectos (algunos de ellos benéficos, otros negativos) de los miembros del cBc sobre el ambiente y diversos aspectos relacionados con la actividad

humana. Dentro de los efectos benéficos se destacan la capacidad como biodegradadores de compuestos aromáticos clorados presentes en pesticidas y herbicidas; la posibilidad de ser usados como biopesticidas y bioprotectores de diversos cultivos en virtud de su capacidad de sintetizar compuestos con actividad antimicrobiana, y como agentes promotores del crecimiento de plantas relacionado con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico [24,45].

Si bien en algún momento el estudio de los efectos benéficos del cBc tuvo importancia, hoy en día los mayores esfuerzos se focalizan en la erradicación de estas bacterias como patógenas y/o contaminantes.

En su momento, algunas cepas del cBc fueron patentadas ante la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA) como agentes de biorremediación o como biopesticidas. Sin embargo, actualmente la diseminación del cBc en el ambiente para tales fines está restringida y las patentes concedidas han sido revocadas debido al riesgo que ello implica sobre la salud humana.

Los efectos adversos del cBc se pueden agrupar en tres categorías: patógeno de vegetales, patógeno oportunista para el ser humano y contaminante industrial.

El efecto fitopatógeno del cBc no es tan relevante como el de otras especies de *Burkholderia*. Afecta principalmente a cebollas, a las que causan pardeado y ablandamiento de los tejidos de sus bulbos [8]. *B. cepacia* es la especie mayoritariamente asociada a este efecto.

En los párrafos siguientes nos focalizaremos en los dos aspectos más relevantes del cBc: como patógeno y como contaminante.

El cBc como patógeno humano

Debido a que las industrias son responsables por la calidad e inoculad microbiológica de los productos que liberan al mercado, la descripción del rol del cBc como patógeno tiene como objetivo generar conciencia sobre el impacto que los productos contaminados pueden causar sobre un sector de la población.

Hace aproximadamente 30 años que el cBc emergió como patógeno oportunista. El cBc no produce infecciones en individuos sanos, pero si lo hace en personas inmunocomprometidas [3,46]. Dentro de este grupo, los pacientes fibroquísticos (FQ), son particularmente afectados [47]. Otro grupo de pacientes en donde se han reportado infecciones, son aquellos que sufren de enfermedad granulomatosa crónica. La infección en los mismos produce sepsis y neumonía, y es la segunda causa de muerte [11,46].

Existen además un número importante de reportes de infecciones intrahospitalarias contraídas por pacientes con distintas patologías, por el uso de material contaminado con el cBc.

Los miembros del cBc pueden colonizar el tracto respiratorio de los pacientes FQ. En muchos casos, se han reportado infecciones crónicas asintomáticas. Sin embargo, parte de los pacientes infectados evolucionan desfavorablemente con un deterioro rápido que no puede ser controlado clínicamente y se lo conoce como "síndrome cepacia" [47]. Este deterioro incluye neumonía y septicemia que por lo general ocasionan la muerte del paciente.

Si bien todas las especies del cBc infectan a individuos FQ, las cepas de *B. cenocepacia* y *B. multivorans* son las que predominan a nivel mundial [24,48]. En Argentina, *B. contaminans* es la especie más frecuentemente aislada tanto de pacientes FQ como no FQ [49,50]. En los últimos años, la incidencia de esta especie en pacientes FQ se ha incrementado en países como España y Portugal; y por otra parte ha sido asociada a diferentes brotes hospitalarios debido al uso de productos contaminados en Alemania y EEUU [51,52,53,54].

La evolución clínica de los pacientes es variable incluso entre pacientes infectados con la misma variedad clonal[24]. Sin embargo, *B. cenocepacia*, *B. multivorans* y recientemente *B. dolosa* [46,55], están señaladas como las especies de mayor virulencia y por lo general los casos de síndrome cepacia están asociados con alguna de ellas. Por otro lado, dadas las altas tasas de mortalidad post transplante, en algunos países los pacientes infectados con *B. cenocepacia* son excluidos de las listas de transplante pulmonar [56].

Todos los miembros del cBc son, en mayor o menor medida, resistentes a la mayoría de los antibióticos [34]. La terapia con estos agentes suele ser inefectiva y los mayores esfuerzos se concentran en prevenir las infecciones. Dado que el cBc puede transmitirse persona a persona, principalmente a través de aerosoles generados cuando el individuo tose, las principales medidas para el control de infecciones apuntan a evitar el contacto entre pacientes

no infectados con aquellos que si lo están [57]. Por otro lado, diversos reservorios del cBc como los ambientes naturales o los productos contaminados adquirieron importancia clínica, principalmente después que distintos trabajos reportaron similitudes entre cepas aisladas en pacientes y en el ambiente [19,20,58]. A partir de ello, se ha impulsado la toma medidas preventivas destinadas a evitar la diseminación del cBc a través del medio ambiente o de productos contaminados. En este sentido, la prevención de contaminaciones de productos farmacéuticos y cosméticos con microorganismos del cBc tiene importante fundamento clínico sanitario.

El cBc como contaminante

Dada la versatilidad del cBc, su capacidad de formar biopelículas y su resistencia a los agentes biocidas, estos microorganismos han adquirido importancia como contaminantes de diversos productos [19]. Las industrias farmacéuticas y cosméticas no son ajenas a este problema. Además del riesgo sanitario que implica, la contaminación con el cBc puede generar en algunos casos distintas alteraciones en los productos (aparición de turbidez, generación de olores, cambios de viscosidad y de color).

Existen numerosos trabajos que señalan al cBc como contaminante en fármacos, cosméticos, material biomédico, desinfectantes, etc [4,5,6]. Este hecho se aprecia también en reportes de las oficinas de control de medicamentos en donde se pueden rastrear gran cantidad de retiros del mercado de productos contaminados con el cBc. Un estudio señala que entre 1998 y 2006 hubo en EEUU 327 productos farmacéuticos contaminados retirados del mercado por parte de la Food and Drug Administration (FDA) (134 formas farmacéuticas no estériles y 193 productos estériles). Los miembros del cBc fueron los microorganismos contaminantes más frecuentes ya que se aislaron en el 22% de los productos no estériles y en el 2,5 % de los estériles [4].

Debido a su condición de patógenos oportunistas, el contacto de la población sana con productos contaminados con el cBc no implica mayores riesgos sanitarios. El problema surge cuando alguno de los productos contaminados es utilizado en pacientes susceptibles (Tabla 1), o cuando desinfectantes que se encuentran contaminados [5] son empleados para la desinfección hospitalaria u hogareña donde residen estos pacientes. Vonberg y Gastmeier señalan a los miembros del cBc como unos de los más frecuentemente implicados en brotes infecciosos hospitalarios por el empleo de productos y material médico contaminados [7].

A nivel hospitalario, el uso de material contaminado ha causado un número importante de infecciones. En la Tabla 1 se detallan algunos casos de productos contaminados con el cBc asociados a infecciones intrahospitalarias. Es notable el caso de geles en Canadá que permanecieron contaminados y produjeron inconvenientes por catorce años [59]. En relación con el caso del docusato sódico contaminado, la FDA informó en el 2017 un brote más debido al uso de otro lote elaborado por el mismo fabricante. Como consecuencia de esto el fabricante retiró del mercado todos los lotes elaborados en los últimos nueve meses de 22 productos líquidos [52,60].

Tabla 1: *Reportes de productos y material médico contaminado con el cBc*

Producto	Lugar	Año	Referencia bibliográfica
Emulsión corporal	España	2006-2007	64
Gel para ecografía	Canadá	1992-2005	59
Catéter para hemodiálisis	Italia	2005	65
Salbutamol	Arabia Saudita	2006	66
Enjuague bucal	EEUU	1996-1998	67
Toallitas humedecidas para limpieza	Alemania	2008	53
Gluconato de clorhexidina	EEUU	2014-2015	68
Solución de docusato sódico	EEUU	2016	52

En Argentina, en los últimos años se produjeron dos retiros de mercado debido a contaminaciones con el cBc: en 2012 se retiró un lote de ranitidina y en 2015 un lote de gel para ecografía hipoalergénico. Ambos retiros de mercado surgieron por reportes de farmacovigilancia iniciados por hospitales [61,62].

A pesar de la patogenicidad de estos microorganismos y los numerosos reportes como contaminantes; su búsqueda no es obligatoria para ninguna codificación regulatoria de fármacos o cosméticos. Sólo para algunas entidades están considerados microorganismos objetables [63]. Es por esta razón que las industrias no buscan de rutina al cBc y los datos que se poseen muchas veces surgen de investigaciones científicas que se plantean generalmente cuando se rastrea la causa de algún brote infeccioso, o bien cuando las empresas tienen problemas por el deterioro de algún producto. Por lo tanto se puede suponer mayor presencia del cBc como contaminante que la efectivamente registrada.

De lo dicho anteriormente, se desprende que es muy difícil establecer con certeza la frecuencia con que estos microorganismos producen contaminaciones en productos farmacéuticos o cosméticos.

Un análisis de productos en el mercado realizado a cabo en nuestro laboratorio reveló que, de 62 muestras de fármacos y cosméticos, dos se hallaban contaminadas con el cBc (una solución antiséptica y una crema facial cosmética). En tanto que en productos limpieza y cuidado del hogar fue donde se hallaron mayor cantidad de muestras contaminadas. De 70 muestras analizadas, seis de acondicionadores de ropa, cinco de limpiadores líquidos para el hogar con actividad desinfectante y una de quitamanchas se hallaron contaminadas con el cBc. Las especies halladas fueron *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B vietnamiensis*, *B. contaminans* y *B. lata*. Estas dos últimas fueron las aisladas más frecuentemente. Cabe señalar que todas estas especies, también fueron halladas en pacientes de nuestro país [49].

Por lo general, las contaminaciones surgen a partir de la presencia de estos microorganismos en el agua utilizada en alguna de las etapas de producción. La provisión de agua y los sistemas de purificación constituyen los principales puntos críticos, ya que estos microorganismos se alojan en cañerías, atraviesan las distintas etapas de purificación, forman biopelículas y son difíciles de erradicar. Al igual que lo reportado [4], la mayor cantidad de cepas del cBc de origen industrial aisladas en nuestro laboratorio provienen de muestras de agua purificada o destilada.

La desinfección periódica de los sistemas de agua y la detección temprana de estos microorganismos son herramientas fundamentales para el control de contaminaciones con el cBc.

Partiendo de la base que las industrias poseen procedimientos operativos para la desinfección de los sistemas de agua, sólo se puede recomendar en este punto que se contemple la eficiencia de los desinfectantes frente al cBc y señalar que, dada la capacidad de adaptación de estos microorganismos, es fundamental la rotación de los agentes biocidas empleados.

Si se tiene en cuenta que el conocimiento de la efectividad de los desinfectantes frente al cBc es un punto básico para implementar medidas de saneamiento, la información científica al respecto es realmente escasa. Los estudios de efectividad biocida están realizados con agentes que, si bien algunos se usan en la industria, son mayoritariamente usados en la desinfección hospitalaria [33,35]. En las fichas técnicas de productos la información también es limitada y por lo general se habla de "*Burkholderia cepacia*" sin tener en cuenta que es un complejo integrado por varias especies que podrían tener comportamientos diferentes frente a un desinfectante.

Casi siempre la eliminación de estos microorganismos de las líneas de producción suele ser muy problemática. Además de la resistencia intrínseca del cBc a distintos biocidas, una vez que forman biopelículas, la acción de los desinfectantes suele ser mucho menos efectiva. La biopelícula implica algo más que una barrera mecánica que impide el contacto con el agente biocida. Recientemente se ha demostrado la expresión de mecanismos de resistencia en biopelículas de *B. cenocepacia* que disminuyen la efectividad de agentes oxidantes y hacen que soluciones de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos, o hipoclorito de sodio al 0,05% durante 5 minutos, no eliminen más del 50% de las bacterias presentes en la biopelícula [32]. El agua a más de 65 ºC y durante 15 segundos de contacto es capaz de reducir más del 99,999% del número de bacterias viables del cBc presentes en una biopelícula [32]. Sin embargo no está demostrada la eliminación total de las bacterias presentes. A raíz de esto, es frecuente observar que luego de la desinfección del sistema, la presencia de los microorganismos no es detectada en los análisis inmediatos, pero luego de un tiempo la contaminación vuelve a aparecer.

Agentes de uso regular en líneas de purificación de agua, como la radiación ultravioleta (UV) o el ozono, tampoco han sido profundamente estudiados frente al cBc. Estudios propios nos permiten señalar que para lograr una reducción mayor al 99,999% de microorganismos del cBc, en un sistema de purificación de agua se debería contar

con radiaciones UV mayores a 165 mJ/cm^2. Sin embargo, no observamos una eliminación completa de los microorganismos y fue posible recuperar algunas especies del cBc a la salida de tratamientos con esta radiación UV [49].

Respecto a la detección temprana del cBc, probablemente el recuento de microorganismos mesófilos totales empleado en el control microbiológico de los sistemas de agua no sea la medida más efectiva. Cuando un recuento microbiano supere el nivel de alerta establecido debido a una contaminación con el cBc, seguramente dichos microorganismos ya hayan formado biopelículas y colonizado parte del sistema de purificación. La búsqueda del cBc mediante enriquecimiento de 100 mL de agua en caldo tripteína soja con incubación durante 48 horas a 30ºC, y el aislamiento en un medio selectivo resulta una medida más efectiva. Sin embargo, dado que esto no se encuentra recomendado en ninguna codificación, queda en la decisión de cada industria basándose en la evaluación del riesgo que implica una contaminación del sistema de agua y en el análisis de costos-beneficios, la implementación de dicha medida.

Por otro lado, cabe señalar que cuando en el recuento microbiano se emplea el medio R2A la recuperación del cBc es más efectiva que cuando se emplea agar Tripteína Soja.

Finalmente, si bien el agua es la fuente de contaminación más habitual, es preciso indicar que no es la única. Otras materias primas, principalmente aquellas de origen natural, pueden ser vehículo de estos microorganismos.

En los productos terminados, muchas veces la acción de los conservadores no es suficiente frente al cBc dada la capacidad de estos microorganismos de adaptarse y hasta proliferar a expensas del conservador. Existen reportes sobre la contaminación con el cBc de productos conservados con cloruro de benzalconio [36] y con metil y propilparabeno [69]. En ambos casos se indica además la capacidad de los microorganismos de usar dichos conservadores como fuentes de carbono. También se ha descripto la capacidad de adaptación de cepas del cBc al ácido benzoico, al formaldehído y a imidazolidinil urea [70,71]. En un estudio realizado con 83 cepas aisladas de productos industriales, la mayoría de los conservadores evaluados logró la inhibición de la mayor parte de las cepas a las concentraciones máximas de uso. Sin embargo también evidenció la capacidad de adaptación de algunas de las cepas a los conservadores y que sólo el fenoxietanol y la dimetilol dimetil hidantoína tuvieron efecto bactericida sobre todas las cepas. Este mismo estudio recomienda el uso de combinaciones de conservadores para prevenir la proliferación bacteriana debido a la adaptación de los miembros del cBc a los conservadores utilizados [44].

El uso de microorganismos del cBc no está contemplado en los ensayos de desafío para conservadores codificados en Farmacopeas. Algunas publicaciones como el Handbook of Biocide and Preservative Use [71] o Cosmetic and Drug Microbiology [72] recomiendan la inclusión de la cepa de *B. cepacia* ATCC 25416 en los ensayos. Sin embargo está demostrado que existen cepas dentro del cBc que presentan mayor resistencia que la citada frente a un gran número de agentes biocidas [34]. De los microorganismos especificados en las Farmacopeas para realizar los ensayos de desafío, *P. aeruginosa* es aquel que se encuentra taxonómicamente más cercano al cBc. A partir de esto, podría suponerse similitud de comportamiento del cBc con *P. aeruginosa* frente a los conservadores. Ensayos comparativos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que los miembros del cBc expresan mayor resistencia que *P. aeruginosa* frente a un gran número de conservadores cuando son evaluados en medios con escasa cantidad de nutrientes [49]. Bajo estas condiciones el cBc crece en forma mucho más lenta y las colonias desarrolladas son sumamente diminutas. Esto es lo que suele observarse cuando fármacos o cosméticos (que por su composición podrían suponerse medios pobres en nutrientes y hostiles para el desarrollo microbiano), se contaminan con el cBc: desarrollo lento de microorganismos altamente resistentes a los agentes conservadores.

Metodología para la búsqueda e identificación del cBc en productos farmacéuticos y cosméticos

Otro aspecto importante relacionado con la problemática del cBc como contaminante, es que no existe consenso ni metodología estandarizada para la búsqueda de estos microorganismos en productos farmacéuticos o cosméticos. Este hecho trae aparejado un importante número de identificaciones erróneas por parte de los laboratorios microbiológicos de las distintas industrias. Como ejemplo de esto, en los últimos años hemos recibido en nuestro laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, 85 cepas de distintas industrias identificadas presuntamente como miembros del cBc. Sólo 12 de las mismas (el 14%) fueron efectivamente confirmadas como tales cuando las estudiamos con técnicas de biología molecular (PCR del gen *recA*). Dada esta situación, decidimos consultar en las distintas industrias cuál era la metodología seguida para la detección de estos microorganismos. Observamos que la mayoría de ellas no tenían incorporado el empleo de medios selectivos para el aislamiento del cBc y que la identificación se basaba en el uso de kits comerciales (por

ejemplo, el API test) a partir de colonias recuperadas de medios no selectivos para el recuento de microorganismos mesófilos; o en medios para el aislamiento de *P. aeruginosa* [49]. Respecto al uso de los kits comerciales, es importante aclarar que existe bibliografía que señala la baja sensibilidad y especificidad de estos elementos para la identificación del cBc [73,74].

Teniendo en cuenta la necesidad de contar con una técnica para la detección e identificación del cBc en fármacos y cosméticos que sea aplicable en los laboratorios microbiológicos de las distintas industrias, evaluamos diferentes medios y condiciones de cultivo que puedan ser aplicados al clásico esquema de enriquecimiento, aislamiento en medio selectivo e identificación por pruebas bioquímicas.

El caldo tripteína soja (TSB) funciona correctamente en la recuperación de los miembros del cBc cuando es incubado a 30ºC por no menos de 48 hs.

Por otro lado, existen diversos medios selectivos para el aislamiento del cBc. El agar BCSA selectivo para *B. cepacia* [75] es el medio más empleado. Principalmente recomendado para muestras clínicas, posee una combinación de antibióticos (polimixina B, gentamicina y vancomicina) que forman la base de su selectividad; además se encuentra disponible comercialmente. Algunos investigadores sugieren que el BCSA, dada su concentración de antibióticos puede resultar inefectivo para la recuperación de cepas de origen ambiental [21] por lo que proponen para tal fin el empleo de otros medios como el TB-T (trypan blue- tetraciclina) [76] o el medio PCAT (con ácido azelaico y triptamina) [77]. Estos medios no se consiguen en forma comercial y por otra parte algunos de sus ingredientes (el trypan blue por ejemplo) están señalados como potencialmente carcinogénicos.

Realizamos un estudio comparativo de los distintos medios selectivos, mediante el método ecométrico, empleando cepas del cBc de colección y otras aisladas de productos industriales. Observamos que el medio BCSA resultó el más adecuado para el aislamiento del cBc de muestras de fármacos y cosméticos; tanto por la recuperación de cepas como por la selectividad en presencia de otros microorganismos como *P. aeruginosa* [49].

Por último, en cuanto a las pruebas bioquímicas, además de la ya mencionada carencia de los kits comerciales, la correcta identificación de las especies del cBc no puede ser realizada exclusivamente mediante pruebas bioquímicas tradicionales [11,74] ya que las distintas cepas del cBc pueden dar resultados variables en un gran número de pruebas. La identificación certera del cBc debe ser llevada a cabo por biología molecular. La reacción de PCR del gen *recA* [16] es la más difundida para la identificación del complejo, mientras que para la discriminación entre las especies del mismo, el análisis de secuencias del gen *recA* es una de las técnicas más adecuadas.

Una prueba bioquímica de gran utilidad, muy empleada en el ámbito clínico es la de lisina decarboxilasa. La mayoría de las cepas de las distintas especies del cBc (excepto *B. dolosa*) dan positiva esta prueba [13]. Sin embargo, hemos observado que la metodología con que esta prueba es llevada a cabo puede dar resultados erróneos. El uso de medios comerciales en ocasiones puede dar falsos negativos hecho que no hemos observado con los discos reactivos [49].

Existe una prueba en base a un medio con glucosa y arginina para la discriminación de *P. aeruginosa* y otros microorganismos [78], que fue recomendado como una herramienta útil para disminuir el número de falsos positivos que desarrollan en los medios selectivos para el cBc [79]. El uso de este medio no está muy difundido y no se dispone comercialmente, sin embargo en pruebas llevadas a cabo en nuestro laboratorio demostró ser muy efectivo para la identificación del cBc. El medio se prepara en tubos formando pico y columna. La mayoría de las cepas del cBc mantienen el color verde original del medio en la columna y viran a amarillo el pico cuando se incuban a 30 ºC durante 48 horas, mientras que un pequeño porcentaje vira todo el medio a amarillo. Dado que algunas especies taxonómicamente cercanas al complejo (*Burkholderia gladioli* por ejemplo) dan resultados similares al cBc, no es recomendable como única prueba de identificación. Sin embargo constituye un excelente complemento de los kits comerciales.

Los ensayos realizados en laboratorio nos permiten sugerir la siguiente marcha para la detección e identificación del cBc:

- Enriquecimiento en caldo tripteína soja con incubación a 30º C por no menos de 48 hs
- Aislamiento en agar BCSA, incubación a 30º C por 48 hs.
- En caso de tener desarrollo de colonias en BCSA (el medio no es diferencial y las colonias del cBc pueden tener diferentes morfologías en este medio) realizar un repique en agar Tripteina Soja, incubarlo 24 - 48 hs a 30ºC y realizar pruebas bioquímicas. Se sugiere la prueba de arginina-glucosa combinada o bien

con la de lisina decarboxilasa realizada con discos reactivos, o con kits comerciales de identificación. La combinación de estas pruebas arrojan una identificación bastante certera del cBc que luego debería ser confirmada por PCR del gen *recA* en algún laboratorio que disponga de dicha herramienta.

Si bien este esquema está en etapa de validación, podemos asegurar que la inoculación en fármacos y cosméticos de un bajo número de microorganismos pertenecientes a distintas especies del cBc (cepas de colección y cepas aisladas de productos contaminados), arrojó muy buenos resultados de recuperación de las cepas estudiadas. Por otro lado, si las ya mencionadas 85 cepas identificadas presuntamente como cBc que recibimos en nuestro laboratorio se hubiesen estudiado mediante aislamiento en BCSA y pruebas bioquímicas de lisina decarboxilasa y arginina glucosa; se habrían recibido solamente 16 cepas: las 12 cepas pertenecientes al cBc estarían dentro de estas 16 y se habría bajado el número de falsos positivos de 86% a 25%.

Por otra parte, una herramienta que ha surgido con fuerza para la identificación microbiana es la técnica de MALDI-TOF (siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* acoplada al detector denominado *Time-Of-Flight*). Sin entrar en detalles sobre el fundamento de dicha técnica, mencionaremos que unas de sus principales ventajas son la rapidez y precisión en la identificación de los microorganismos. Para que esto se cumpla el sistema debe contar con una extensa librería espectral de microorganismos. Está demostrado que una adecuada cantidad de espectros de los microorganismos del cBc permite lograr la identificación a nivel especie en cuestión de horas [(80)]. Esta técnica ha trascendido el campo de la investigación y actualmente se encuentran equipos comerciales disponibles en nuestro país. Los mismos se están empleando principalmente en el ámbito clínico, y una de las desventajas que presentan en cuanto a la identificación de especies del cBc es que las bibliotecas espectrales no contienen espectros de las cepas locales y particularmente de *B. contaminans.* Dicha cuestión se resuelve mediante la incorporación en la base de datos de espectros de aislamientos locales; tarea que está siendo llevada a cabo por distintos grupos de trabajo. Teniendo en cuenta las ventajas de esta técnica, no sólo aplicable para el cBc, su utilidad en el laboratorio de microbiología de industrias debería ser considerada, aun teniendo en cuenta una de sus principales desventajas en la actualidad que es su elevado costo.

ANEXO: Composición de medios de cultivo

Burkholderia cepacia Selective Agar (BCSA):

Cloruro de sodio	5,0 g
Sacarosa	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extracto de Levadura	1,5 g
Agar	14 g
Cristal violeta	0,002 g
Rojo fenol	0,08 g
Gentamicina	0,01 g
Vancomicina	0,0025 g
Polimixina B	600.000 U
Agua destilada c.s.p.	1 L

pH final 7,0.
Esterilización por autoclave.
Los antibióticos se esterilizan por filtración y se agregan posteriormente al autoclavado.

Medio de Arginina Glucosa:

Caldo nutritivo	0,2 g
Clorhidrato de L-arginina	0,1 g
Glucosa	1,0 g
Mezcla de colorantes	6,0 mL
Agar	1,0 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Antes de esterilizar por autoclave, ajustar pH a 7,4.
Distribuir en tubos de manera de formar columna y pico una vez autoclavado.
Mezcla de colorantes: rojo cresol 0,03 g; azul de bromotimol 0,02 g. Disolver en 100 mL de NaOH 0,01N.

BIBLIOGRAFIA

1. Palleroni N. (2005). Genus I. Burkholderia. En: Bergey´s manual of systematic bacteriology. Vol 2. D Brenner, J Garrity, N Krieg, J Staley (Eds). Springer, Amsterdam, pp 575-600.

2. De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacobs JA, Currie BJ, P Vandamme. (2015) *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 65(7):2265-2271.

3. Govan JR, JE Hughes, P Vandamme. (1996). *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* 45:395-407.

4. Jimenez L. (2007). Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA J Pharm Sci Technol* 61:383-399.

5. Oie S, A Kamiya. (1996). Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *Am J Infect Control* 24:389-395.

6. Perry B. (2001). Cosmetic microbiology. *Microbiol Today* 28:185-187.

7. Vonberg RP, P Gastmeier. (2007). Hospital-acquired infections related to contaminated substances. *J Hosp Infect* 65:15-23.

8. Burkholder W. (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115-117.

9. Yabuuchi E, Y Kosako, H Oyaizu, I Yano, H Hotta, Y Hashimoto, T Ezaki, M Arakawa. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36:1251-1275.

10. Vandamme P, JR Govan, JJ LiPuma. Diversity and rol of *Burkholderia* sp. (2006). En: *Burkholderia*: molecular microbiology and genomics. T Coenye y P Vandamme (Eds). Horizon Scientific Press, Londres, pp1-28.

11. Coenye T, P Vandamme, JR Govan, JJ LiPuma. (2001). Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 39:3427-3436.

12. Vandamme P, B Holmes, M Vancanneyt, T Coenye, B Hoste, R Coopman, H. Revets, S Lauwers, M Gillis, K Kersters, JR Govan. (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:1188-1200.

13. Coenye T, JJ LiPuma, D Henry, B Hoste, K Vandemeulebroecke, M Guillis, D Speert, P Vandamme. (2001). *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:271-279.

14. Coenye T, E Mahenthiralingam, D Henry, JJ LiPuma, S Laevens, M Gillis, DP Speert, P Vandamme. (2001). *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1481-1490.

15. Vandamme P, D Henry, T Coenye, S Nzula, M Vancanneyt, JJ LiPuma, DP Speert, JR Govan. (2002). *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex

bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. FEMS *Immunol and Med Microbiol* 33:143–151.

16. Mahenthiralingam E, J Bischof, SK Byrne, C Radomski, J Davies, Y Av-Gay, P Vandamme. (2000). DNA-based diagnostic approaches for the identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis, Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J Clin Microbiol* 38:3165–3171.

17. Vandamme P, B Holmes, T Coenye, J Goris, E Mahenthiralingam, JJ LiPuma, JR Govan. (2003). *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.–a new twist to an old story. *Res Microbiol* 154:91–96.

18. Vanlaere E, JJ LiPuma, A Baldwin, D Henry, E De Brandt, E Mahenthiralingam, D Speert, C Dowson, P Vandamme. (2008). *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1580-1590.

19. Mahenthiralingam E, Baldwin A, C Dowson. (2008). *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* 10:1365-1372.

20. Baldwin A, E Mahenthiralingam, P Drevinek, P Vandamme, JR Govan, D Waine, J LiPuma, L Chiarini, C Dalmastri, D Henry, D Speert, D Honeybourne, M Maiden, CG Dowson. (2007). Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infection. *Emerg Infect Dis*13:458-461.

21. Miller S, JJ LiPuma, JL Parke. (2002). Culture-based and non-growth-dependent detection of the *Burkholderia cepacia* complex in soil environments. *Appl Environ Microbiol* 68:3750-3758.

22. Seo ST, K Tsuchiya. (2004). PCR-based identification and characterization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources. *Lett Appl Microbiol* 39:413-419.

23. Vermis K, M Brachkova, P Vandamme, H Nelis**.** (2003). Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. *Syst Appl Microbiol* 26:595-600.

24. Mahenthiralingam E, T Urban, J Goldberg. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol* 3:144-156.

25. Tsang JS. (2004). Molecular biology of the *Burkholderia cepacia* complex. *Adv Appl Microbiol* 54:71-91.

26. Lessie T, W Hendrickson, B Manning, R Devereux. (1996). Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett* 144:117-128.

27. Holden M, J Parkhill. (2003). The sequencing and analysis of the *Burkholderia cenocepacia* genome. *Pediatr Pulmonol Suppl* 25:286.

28. Winsor GL, Khaira B, Van Rossum T, Lo R, Whiteside MD, FS Brinkman. (2008).The Burkholderia Genome Database: facilitating flexible queries and comparative analyses. *Bioinformatics* 1;24(23):2803-2804.

29. Haim MS, Mollerach M, Van Domselaar G, Teves SA, Degrossi J, ST Cardona. (2016). Draft genome sequences of Burkholderia contaminans FFI-28, a strain isolated from a contaminated pharmaceutical solution. *Genome Announc.* 2016 Oct 27;4(5). pii:e01177-16.

30. Conway BD, V Venu, D Speert. (2002). Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 184:5678-5685.

31. Cunha MV, SA Sousa, JH Leitão, LM Moreira, PA Videira, I Sá-Correia. (2004). Studies on the involvement of the exopolysacharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. *J Clin Microbiol* 42:3052-3058.

32. Miyano N, S Oie, A Kamiya. (2003). Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia. Biol Pharm Bull* 26:671-674.

33. Peeters E, H Nelis, T Coenye. (2008). Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenopacia* biofilms. *J Hosp Infect* 70:361-368.

34. Vermis K, P Vandamme, H Nelis. (2003). *Burkholderia cepacia* complex genomovars: utilization of carbon sources, susceptibility to antimicrobial agents and growth on selective media. *J Appl Microbiol* 95(6):1191-1199.

35. Rose H, A Baldwin, C Dowson, E Mahenthiralingam. (2009). Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* 63:502-510.

36. Geftic SG, H Heymann, FW Adair. (1979). Fourteen years survival of *Pseudomonas cepacia* in a salt solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl Environ Microbiol* 37:505-510.

37. Burns J, C Wadsworth, J Barry, C Goodall. (1996). Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 307-313.

38. Chiesa C, P Labrozzi, S Aronoff. (1986). Decreased baseline -lactamase production and inducibility associated with increased piperacillin susceptibility of *Pseudomonas cepacia* isolated from children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 20:1174-1177.

39. Burns J, D Lien, L Hedin. (1989). Isolation and characterization of dihidrofolate reductase from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant *Pseudomonas cepacia. Antimicrob Agents Chemother* 33:1247-1251.

40. Silva IN, Santos PM, Santos MR, Zlosnik JE, Speert DP, Buskirk SW, Bruger EL, Waters CM, Cooper VS, L Moreira. (2016). long-term evolution of Burkholderia multivorans during a chronic cystic fibrosis infection reveals shifting forces of selection. *mSystems*. 24;1(3). pii: e00029-16.

41. Vial L, Chapalain A, Groleau MC, E Déziel . (2011). The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: a tribute to adaptation. *Environ Microbiol* 13(1):1-12.

42. Zhu B, Ibrahim M, Cui Z, Xie G, Jin G, Kube M, Li B, X Zhou. (2016). Multi-omics analysis of niche specificity provides new insights into ecological adaptation in bacteria. *ISME J* 10(8):2072-2075.

43. Bragonzi A, Paroni M, Pirone L, Coladarci I, Ascenzioni F, A Bevivino. (2017). Environmental Burkholderia cenocepacia strain enhances fitness by serial passages during long-term chronic airways infection in mice. *Int J Mol Sci* 14;18(11). pii: E2417.

44. Rushton L, Sass A, Baldwin A, Dowson CG, Donoghue D, E Mahenthiralingam. (2013). Key role for efflux in the preservative susceptibility and adaptive resistance of Burkholderia cepacia complex bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 57(7):2972-2980.

45. Parke J, D Gurian-Sherman. (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annu Rev Phytopathol* 39:225-258.

46. Speert D (2001). Understanding *Burkholderia cepacia*: epidemiology, genomovars and virulence. *Infect Med* 18:49-56.

47. Isles A, I Maclusky, M Corey, R Gold, C Prober, P Fleming, H Levison. (1984). *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 104:206-210.

48. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, L Saiman.(2016).Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2149(2):390-400.

49. Degrossi J, M D´Aquino. (2010). El complejo *Burkholdria cepacia* como patógeno emergente: situación taxonómica y medidas de control aplicables en ámbitos hospitalarios e industriales (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

50. Martina P, Bettiol M, Vescina C, Montanaro P, Mannino MC, Prieto CI, Vay C, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O, Lagares A, A. Bosch. (2013) Genetic diversity of *Burkholderia contaminans* isolates from cystic fibrosis patients in Argentina. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (1):339-344.

51. Coutinho CP, Barreto C, Pereira L, Lito L, Melo Cristino J, I Sá-Correia. (2015). Incidence of *Burkholderia contaminans* at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol*. 2015; 64 (8): 927-935.

52. Marquez L, Jones KN, Whaley EM, Koy TH, Revell PA, Taylor RS, Bernhardt MB, Wagner JL, Dunn JJ, LiPuma JJ, JR Campbell. (2017). An Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex Infections Associated with Contaminated Liquid Docusate. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017; 38 (5):567-573.

53. Martin M, Christiansen B, Caspari G, Hogardt M, von Thomsen AJ, Ott E, F Mattner. (2011). Hospital-wide outbreak of B*urkholderia contaminans* caused by prefabricated moist washcloths. *J Hosp Infect*.; 77 (3):267-270.

54. Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, JA Saéz-Nieto. (2015). Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. 21 (2):150-156.Jones A, M Dodd, JR Govan, V Barcus, C Doherty, J Morris, A Webb. (2004). *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax* 59:948-951.

55. Kalish L, D Waltz, M Dovey, G Potter-Bynoe, A McAdam, JJ LiPuma, C Gerard, D Goldmann. (2006). Impact of *Burkholderia dolosa* on lung function and survival in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 173:421-425.

56. De Soyza A, A McDowell, L Archer, J Dark, S Elborn, E Mahenthiralingam, K Gould, P Corris. (2001). *Burkholderia cepacia* complex genomovars and pulmonary transplantation outcomes in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 358:1780-1781.

57. LiPuma JJ, S Dasen, D Nielson, R Stern, T Stull. (1990). Person-to-person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet* 336:1094-1096.

58. LiPuma JJ, T Spilker, T Coenye, C Gonzalez. (2002). An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 359: 2002-2003.

59. Jacobson M, R Wray, D Kovach, DA Henry D Speert, A Matlow. (2006). Sustained endemicity of *Burkholderia cepacia* complex in a pediatric institution, associated with contaminated ultrasound gel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:362-326.

60. U.S. Food and Drug Administration. Press Announcements. August 11, 2017. https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm571328.htm
61. Disposición ANMAT 7548/12, 27/12/2012. http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/diciembre_2012/Dispo_7548-12.pdf
62. Disposición ANMAT 5587/15, 15/07/15. http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/Julio_2015/Dispo_5587-15.pdf
63. Sutton S. (2006). Microbial Limits Tests the Difference Between "Absence of Objectionable Microorganisms" and "Absence of Specified Microorganisms". *PMF Newsletter* 12 (6): 3.
64. Alvarez-Lerma F, E Maull, R Terrada, C Segura, I Planeéis, P Coll, H Knobel, A Vázquez. (2008). Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care* 12:R10.
65. Lo Cascio G, M Bonora, A Zorzi, E Mortani, N Tessitore, C Loschiavo, A Lupo, M Solbiati, R Fontana. (2006). A napkin-associated outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteraemia in haemodialysis patients. *J Hosp Infect* 64:56-62.
66. Ghazal S, K Al-Mudaimeegh, E Al Fakihi, A Asery. (2006). Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in immunocompetent children caused by contaminated nebulized sulbutamol in Saudi Arabia. *Am J Infect Control* 34:394-398.
67. Molina-Cabrillana J, M Bolaños-Rivero, E Álvarez-León, A Sánchez, M Sánchez-Palacios, D Álvarez, J Sáez-Nieto. (2006). Intrinsically contaminated alcohol-free mouthwash implicated in a nosocomial outbreak of *Burkholderia cepacia* colonization and infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 27:1281-1282.
68. Song JE, Kwak YG, Um TH, Cho CR, Kim S, Park IS, Hwang JH, Kim N, GB Oh. (2017). Outbreak of *Burkholderia cepacia* pseudobacteraemia caused by intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect.* pii: S0195-6701(17)30518-2.
69. Close JA, P Nielsen. (1976). Resistance of a Strain of *Pseumonas cepacia* to esters of p- Hydroxybenzoic acid. *Appl Environ Microbiol.* 31: 718–722.
70. Borovian, G.E. (1983). *Pseudomonas cepacia*: growth in and adaptability to increased preservative concentrations. *J Soc Cosmet Chem.* 34:197-203
71. Rossmoore HW. (1995). Handbook of biocide and preservative use. Blackie Academic & Professional (Eds). Glasgow.
72. English DJ. (2006). Factors in selecting and testing preservatives in product formulations. En: Cosmetic and drug microbiology. Orth DS, Kabara JJ, Denyer SP, et al.(Eds). New York, London, pp 57-101.
73. Shelly DB, T Spilker, E Gracely, T Coenye, P Vandamme, JJ LiPuma. (2000). Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J Clin Microbiol* 38:3112–3115.
74. van Pelt C, C Verduin, W Goessens, M Vos, B Rummler, C Segonds, F Reubsaet, H Verbrugh, A van Belkum. (1999). Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J Clin Microbiol* 37(7):2158-2164.

75. Henry DA, ME Campbell, JJ LiPuma, DP Speert. (1997). Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol* 35:614-619.

76. Hagedorn C, WD Gould, TR Bardinelli, DR Gustavson. (1987). A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl Environ Microbiol* 53:2265-2268.

77. Burbage DA, M Sasser. (1982). A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 72:706.

78. Stewart DJ. (1971). A composite arginine glucose medium for the characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and other gramnegative bacilli. *J Appl Bacteriol* 34:779-86.

79. Vanlaere E, F Hansraj, P Vandamme, JR Govan. (2006). Growth in Stewart´s medium is a simple, rapid and inexpensive screening tool for the identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J Cys Fibros* 5:137-139.

80. Miñán A, Bosch A, Lasch P, Stämmler M, Serra DO, Degrossi J, Gatti B, Vay C, D'aquino M, Yantorno O, D Naumann D. (2009). Rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species including strains of the novel Taxon K, recovered from cystic fibrosis patients by intact cell MALDI-ToF mass spectrometry. *Analyst* 134(6):1138-48.

Capítulo V.5.

Evaluación del Riesgo de Contaminación Microbiológica

Mónica Lagomarsino

Introducción

Proceso de Gestión del riesgo

Ejemplos de la aplicación de la Gestión del Riesgo a los aspectos Microbiológicos

Comentario final

Bibliografía

Introducción

Riesgo se define como la combinación de la probabilidad de ocurrencia de un daño y su severidad [(1)]. El Riesgo microbiológico o riesgo de contaminación microbiana, es entonces la probabilidad de ocurrencia de un daño causado por microorganismos presentes en un producto y la severidad de dicho daño, y depende entre otros, del tipo y número de microorganismos, de la edad y del estado de salud del paciente, y de la vía de administración del producto. Pero el daño puede afectar no sólo al paciente sino además al producto, ocasionándole cambios físico-químicos.

Los principios del tratamiento del riesgo son:

1) La evaluación del riesgo debe tener base científica y su fin es proteger al paciente, y
2) El nivel necesario de la documentación de una evaluación del riesgo debe ser proporcional al nivel de dicho riesgo [(1)].

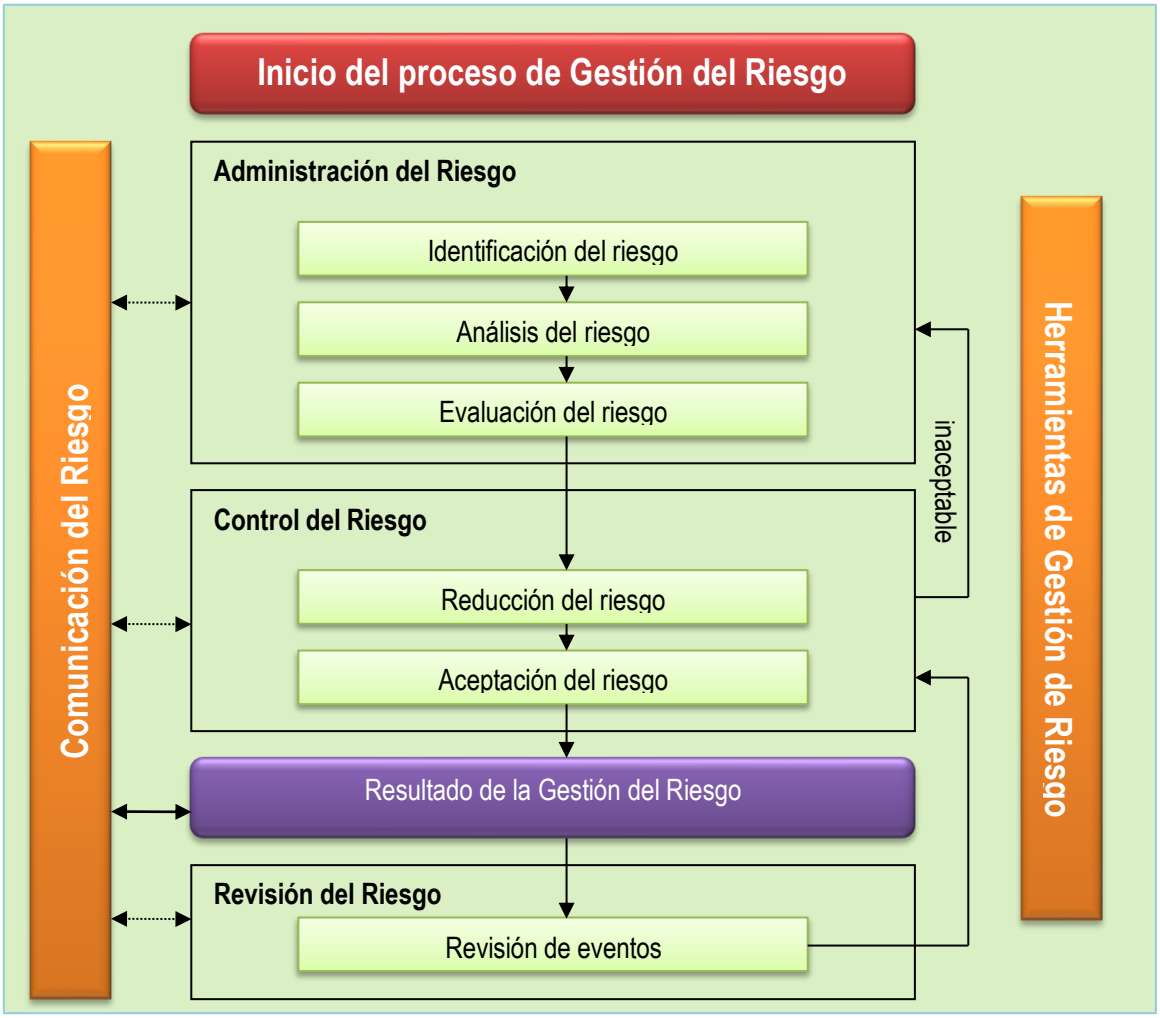
Proceso de Gestión del Riesgo

El proceso de gestión del riesgo ha sido empleado en industrias y en las ciencias de la salud durante mucho tiempo. En la industria farmacéutica en los últimos años ha comenzado a implementarse de una manera más formal y sistemática con el objeto de emplear los recursos en las áreas que requieran más atención por ser las más riesgosas.

En la Figura 1 se esquematiza el proceso de Gestión del riesgo.

La ***Administración del Riesgo*** es un proceso sistemático de organización de la información, por el cual se identifica el peligro o el riesgo existente, luego se analiza y por último se evalúa el riesgo asociado con la exposición a él.

***Figura 1**: El proceso de gestión del riesgo – ICH Q9*



1. <u>Identificación del riesgo:</u>

Varios son los motivos que pueden ocasionar riesgo de contaminación microbiológica. A continuación se mencionan las formas más comunes de identificarlo.

<u>1.a. Por el tipo de producto:</u> El riesgo depende entre otros

(a) de la vía de administración del medicamento, (b) de la cantidad de agua disponible o actividad acuosa a_w y (c) de la presentación, o como monodosis o para múltiples aplicaciones.

(a) Cuando la vía de administración es parenteral u oftálmica, o cuando el producto se aplica a escaras, ulceraciones o quemaduras, el producto requiere ser estéril. Si no es posible asegurar la esterilidad, el riesgo para el paciente es muy alto. En el caso de un producto no obligatoriamente estéril un cierto recuento microbiano está permitido, aunque algunos microorganismos no deben estar presentes según la vía de administración[2,3,4] por presentar riesgo para la salud. Dentro de los productos no estériles, algunos líquidos antiácidos son de difícil preservación, por lo que no sólo constituyen un riesgo para el paciente, sino que además el producto mismo puede cambiar sus características organolépticas debido al desarrollo microbiano.

(b) La actividad acuosa es fundamental para evaluar el riesgo de un producto, ya que por ejemplo, un producto líquido o semilíquido con base acuosa (alta a_w) puede favorecer el desarrollo microbiano, en cambio un producto con baja a_w, si bien no necesariamente es antimicrobiano, sólo por no contener suficiente cantidad de agua disponible no permite el desarrollo microbiano, o sea que la contaminación

no aumentará, aunque una contaminación adquirida durante el proceso de producción puede permanecer inalterada [5].

(c) Otra característica a considerar es si el producto es monodosis, o si por el contrario el envase se abre repetidamente para múltiples aplicaciones, aumentando el riesgo de la contaminación durante el uso. Este riesgo se evalúa mediante el ensayo de efectividad de antimicrobianos [6,7].

1.b. Por el proceso de elaboración: Para efectuar una evaluación de riesgo de un producto es necesario conocer todas las etapas de la elaboración y evaluar cada una para determinar en cuál hay riesgo de contaminación.

En base a los retiros de mercado en USA [8], los orígenes de los microorganismos aislados de productos no estériles en orden descendiente provienen de:

Materias primas ≥ Agua como ingrediente > equipamiento productivo >> ambiente >> personal

Veremos cada tipo de origen:

(a) *Debido a las materias primas*: Si las materias primas son de origen natural pueden contener mayor carga microbiana como por ejemplo talcos, almidones, pancreatina, gelatina. En esos casos puede ser conveniente su decontaminación previa por ejemplo por ionización, si previamente se probó la estabilidad química frente a la radiación ionizante. Pero las materias primas de origen sintético no están exentas de estar contaminadas. En este caso la contaminación depende sobre todo de las etapas finales de la purificación. Sobre todo el riesgo aumenta cuando se utiliza agua para efectuar la purificación o el lavado final de la materia prima.

(b) *Debido al agua*: El agua, cuando es usada como ingrediente para la elaboración de los productos, también es una de las principales causas de contaminación microbiana. El tipo de agua y los requerimientos microbiológicos deben estar de acuerdo al producto a elaborar. El agua puede formar parte de la formulación del producto, o puede requerirse en alguna etapa de la elaboración, por ejemplo para granulación húmeda de un comprimido o para su recubrimiento acuoso; y además se utiliza para el lavado de equipos y utensilios.

(c) *Debido al equipamiento*: Los equipos de producción deben ser adecuados, y los procesos de limpieza deben estar validados, no sólo para demostrar que no queda residuo de activos, sino también

(i) para asegurar que el procedimiento de limpieza es adecuado desde el punto de vista microbiológico,

(ii) para establecer el período durante el cual un equipo puede permanecer sucio sin lavar, y

(iii) para establecer el tiempo en el cual un equipo puede permanecer limpio antes de efectuar una nueva limpieza.

Los mayores riesgos de contaminación en un equipo son

(i) la limpieza inadecuada, por ejemplo en zonas de difícil acceso, burletes, juntas, orificios; y

(ii) la dificultad del secado, ya que la humedad favorece la proliferación microbiana. Por ejemplo cuando los equipos o utensilios se conservan limpios en bolsas de polietileno, sin haber sido previamente completamente secados, puede haber retención de humedad y por ende proliferación de microorganismos. Otro ejemplo es la zona donde se ubican los burletes, que son difíciles de lavar, pero también de secar.

(d) *Debido al ambiente*: las áreas deben ser adecuadas para el tipo de producto que va a elaborarse, y el tipo de monitoreo y su frecuencia deben estar de acuerdo con los procesos que se efectúan en dicha área. Los límites microbiológicos de los monitoreos ambientales deben ser establecidos luego de una

evaluación histórica de los resultados. El ambiente tiene poca incidencia en la producción de productos no estériles, pero es fundamental en el procesamiento aséptico.

(e) *Debido al personal*: Sobre todo en áreas de procesamiento estéril, donde es la más importante causa de contaminación. El personal es el que efectúa todas las tareas en toda la línea de producción, y su grado de capacitación va a influir para evitar riesgos. Debe tenerse en cuenta la capacitación también del personal temporario debido a licencias y a vacaciones, y del personal de mantenimiento asignado a las áreas productivas.

(f) *Debido a la temperatura*: A menudo las temperaturas de secado de productos sólidos son bajas para proteger al activo de la degradación. Cuando ello ocurre, y si además los tiempos de secado son largos, la humedad favorece el desarrollo microbiano. Las temperaturas de almacenamiento del producto y de la muestra a analizar también deben ser tenidas en cuenta.

Para identificar los riesgos de contaminación microbiana durante el proceso, es importante conocer la operatoria para efectuar un análisis del peligro y la búsqueda de puntos críticos de control o *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) [9]. Los puntos críticos de control serán aquellos en los que hay riesgo de incorporación de contaminantes o de desarrollo de los microorganismos existentes. Una vez identificados los puntos críticos, deberá evaluarse la necesidad de controles que puede consistir en monitoreo de aire o superficies, o el muestreo de producto intermedio después de una etapa crítica, dependiendo de (a) las propiedades antimicrobianas del producto y (b) de su historia previa:

(a) *Por las propiedades antimicrobianas del producto*: Cuando se efectúa el ensayo de aptitud del método microbiológico de control de un determinado producto, se identifican sus propiedades antimicrobianas. Cuando existen:

(i) el activo o algún excipiente puede inhibir el desarrollo microbiano;

(ii) o el pH final del producto, sobre todo cuando es muy bajo, puede ser la causa de la inhibición;

(iii) si la a_w es baja, sólo asegura que los microorganismos presentes no podrán desarrollarse, pero puede no ser por sí misma la causa de una acción antimicrobiana; y

(iv) para productos líquidos o semisólidos el ensayo de efectividad de antimicrobianos prueba si la formulación final inhibe o no el desarrollo microbiano de los microorganismos utilizados en el ensayo [6,7].

(b) *Por la historia previa del producto:* Si un producto ha tenido alguna vez un evento que requirió una investigación, debe asegurarse que las acciones correctivas y preventivas han sido tomadas y que luego no hubo otro episodio similar.

2. Análisis del riesgo:

Analizar el riesgo significa clasificarlo cuali o cuantitativamente, asignándole una categoría. Un parámetro que puede ser útil para clasificar el riesgo es su *Detectabilidad* a la que se la puede clasificar en forma cualitativa, por ejemplo como Alta, Media o Baja. Mientras más alta es la *Detectabilidad*, menor es el riesgo. Un ejemplo claro es el ensayo de esterilidad, en el cual la probabilidad de muestrear al menos una unidad contaminada es muy baja (baja *Detectabilidad*) y se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$P = 1 - (1 - \lambda)^N$$

Donde
P es la probabilidad de muestrear una unidad contaminada,
N es el número de unidades muestreadas, y
λ es el porcentaje de unidades contaminadas dividido 100.

Si para un producto estéril es necesario muestrear 20 unidades por medio de cultivo, para un nivel de contaminación del 0.1%, la probabilidad de tomar una unidad contaminada en la muestra es 0.02. Si se aumenta al doble el número de unidades de la muestra, para el mismo nivel de contaminación la probabilidad de que el test de esterilidad sea positivo es 0.04. Con este ejemplo se puede ver claramente que un aumento

en el número de unidades muestreadas no aumenta suficientemente la probabilidad de que un ensayo de esterilidad arroje un resultado positivo. También este ejemplo nos demuestra que una vez que el ensayo de esterilidad da mal, y que no ha existido error del laboratorio, la probabilidad de que en un segundo análisis, aunque sea con el doble de muestra, pueda dar positivo otra vez es tan baja que se correría el riesgo de liberar un producto que no está en condiciones de ser aprobado.

La contaminación microbiana de un inyectable entonces es de alto riesgo por su baja *Detectabilidad*.

Otro parámetro que puede ayudar a clasificar el riesgo es el *Impacto*. Se puede por ejemplo asignar valores como Bajo, Medio y Alto.

Cuando la *Detectabilidad* es baja y el *Impacto* en la salud del paciente es alto, como en el caso del ensayo de esterilidad, el riesgo es Alto. Ver la Tabla 1.

***Tabla 1**: Calificación del riesgo según la Detectabilidad y el Impacto, donde el Riesgo se clasifica como A: Alto, M: Medio y B: Bajo*

		Detectabilidad		
		Alta	Media	Baja
Impacto	Alta	M	A	A
	Media	B	M	A
	Baja	B	B	M

Una manera de evaluar también el daño que puede producirse es mediante la *Severidad* de la contaminación. Ésta puede calificarse como Baja, cuando no se espera ocurrencia de daño, o Media, cuando se espera un impacto moderado o Alto cuando el impacto es severo, por ejemplo podría haber riesgo de muerte para el paciente. En el ejemplo anterior la *Severidad* es siempre alta debido a que un producto estéril no puede contener ningún microorganismo vivo.

Una manera de evaluar el riesgo es utilizando un método FMEA (*Failure Mode and Effect Analysis*), por el cual se asigna un puntaje a cada una de las tres características anteriores, por ejemplo del 1 al 10, y luego se calcula la Probabilidad de riesgo (PR) multiplicando el puntaje de las tres características [10], pero tomando la precaución de asignar a una alta *Detectabilidad* un valor bajo, ya que mide la falla en la detección:

$$PR = Severidad \times Detectabilidad \times Ocurrencia$$

El valor obtenido estará entre 1 y 1000. Este cálculo puede realizarse para cada etapa del proceso, lo cual permite comparar cada una, y así asignar prioridades para la toma de acciones.

3. Evaluación del riesgo:

Se comparan la identificación y el análisis del riesgo, y se tiene en cuenta la fuerza de las evidencias. La evaluación se informa y se comunica.

El ***Control del Riesgo*** incluye la decisión de reducir y/o aceptar el riesgo, o sea reducirlo hasta un nivel aceptable. Pocas veces es eliminable, y aunque sea muy baja siempre existirá la probabilidad de ocurrencia.

A partir del control del riesgo de un determinado producto, puede derivarse en:

(a) posibles mejoras en las etapas de un proceso, para eliminar o al menos disminuir un riesgo identificado,

(b) necesidad de efectuar controles adicionales, por ejemplo en una o más etapas de la elaboración, para detectar tempranamente contaminaciones,

(c) podría ser necesario el establecimiento de límites más estrictos por ejemplo de materias primas o de agua purificada,

(d) en determinadas circunstancias un plan de muestreo diferente puede ser aplicado, por ejemplo se podrían analizar menos lotes del producto (*skip lot*), siempre que esta acción sea adecuadamente justificada.

Cuando el riesgo no puede ser reducido hasta un nivel aceptable, deben repetirse las etapas de la Administración del riesgo, para lograr entonces resultados aceptables.

Una vez obtenidos los ***Resultados de la Gestión del Riesgo***, informados adecuadamente y comunicados, debe ser establecido un plan de monitoreo o ***Revisión de eventos*** con una frecuencia acorde al nivel del riesgo.

Ejemplos de la aplicación de la Gestión del Riesgo a los aspectos Microbiológicos

1) Frecuencia de análisis microbiológicos de productos: Una adecuada evaluación de riesgo puede derivar en la decisión de una disminución de la frecuencia de los análisis microbiológicos de ciertos productos o materiales no estériles. Esta decisión puede ser considerada, basándose en los *"decision tree"* publicados por la *International Conference of Harmonization* en su ICH Q6A [(11)]. Dichos "árboles de decisión" se muestran en las Figuras 2 y 3. La ayuda en la decisión de reducción de la frecuencia de los análisis, y el control microbiano de productos en estabilidad se menciona en la USP[(5)] para productos de baja a_w.

2) Establecimiento de puntos de muestreo: La calificación del riesgo, con la estimación numérica de la *Probabilidad de Riesgo* (PR) puede ser aplicado a la evaluación de diferentes sitios de un equipo de producción para establecer puntos de muestreo con el fin de validar la limpieza desde el punto de vista microbiológico. Para esto podrían considerarse entre otros:

(a) la dificultad para efectuar la limpieza en los diferentes puntos del equipo (*DL*);
(b) la dificultad para el secado posterior a la limpieza (*DS*);
(c) si las piezas involucradas son desarmadas antes de lavar, y
(c) la posibilidad de detección de la falla antes del uso del equipo *(FT*).

Además habría que tener en cuenta que la *Detectabilidad* durante el análisis es baja, debido a que el hisopado, que es el método más frecuentemente utilizado para efectuar estos ensayos, recupera por lo general una baja proporción de los microorganismos que están adheridos a las superficies de los equipos.

Se puede calcular el *Índice de Criticidad* (*IC*), por medio del producto de los valores estimados, cuando se da un valor numérico arbitrario a dichos factores.

$$IC = DL \times DS \times FT$$

Donde *DL* y *DS* son mayores a 1, y
FT está entre 0 y 1.

Podría ser conveniente multiplicar el *IC* de cada punto evaluado por un Factor de Gravedad (*FG*), donde *FG*>1

Comentario final:

Una buena gestión debe comenzar con el desarrollo farmacéutico (ICH Q8)[(12)] donde los riesgos sean analizados en forma temprana desde la formulación en la que se evalúe la eficiencia de distintos sistemas de conservación, la disponibilidad de instalaciones adecuadas al tipo de producto, la presencia o no de agua durante la elaboración, el estado de validación de limpieza de los equipos a utilizar, y la capacitación del personal para efectuar todos los pasos de la elaboración y el control, entre otros factores a considerar, teniendo en cuenta las características del producto.

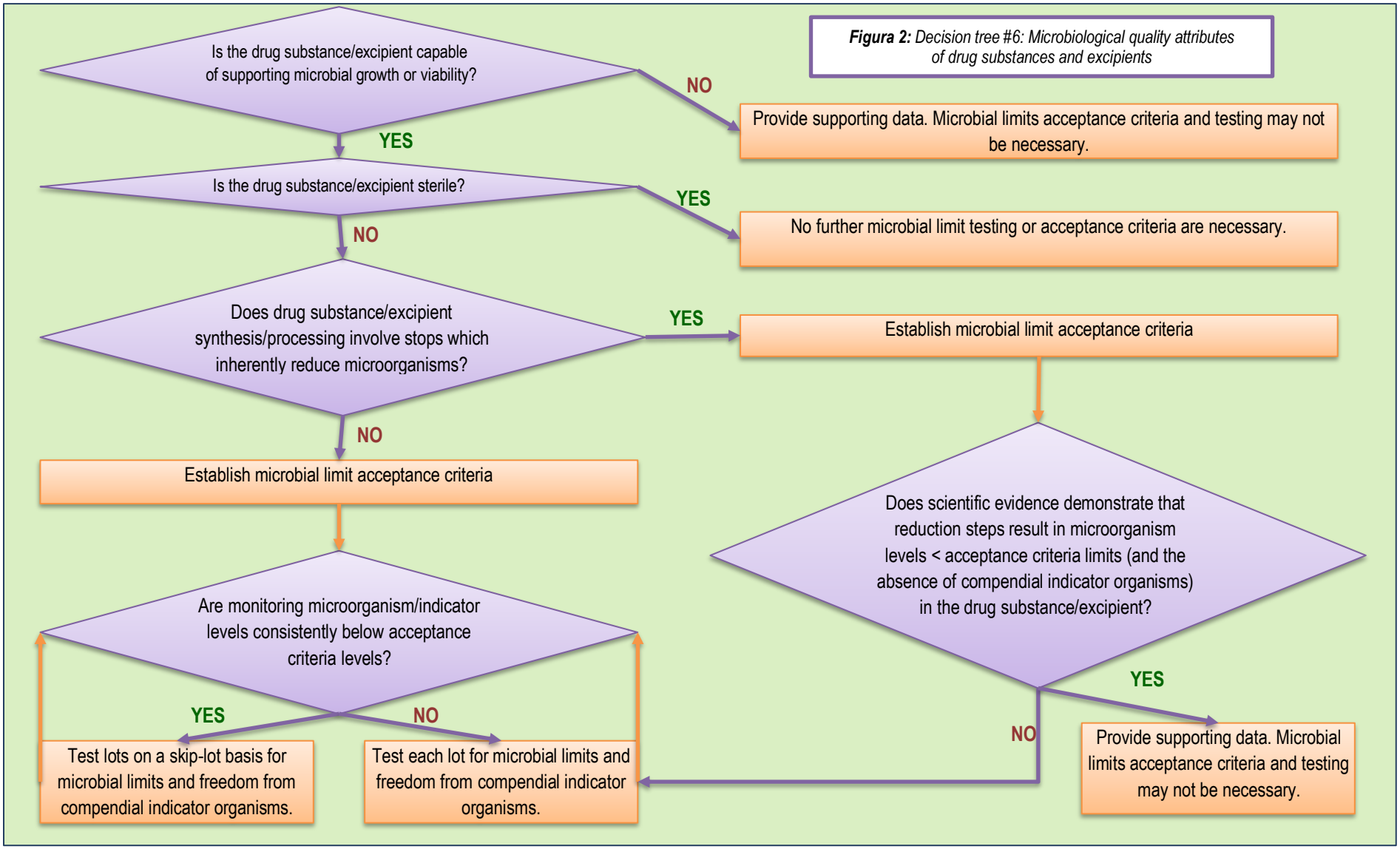
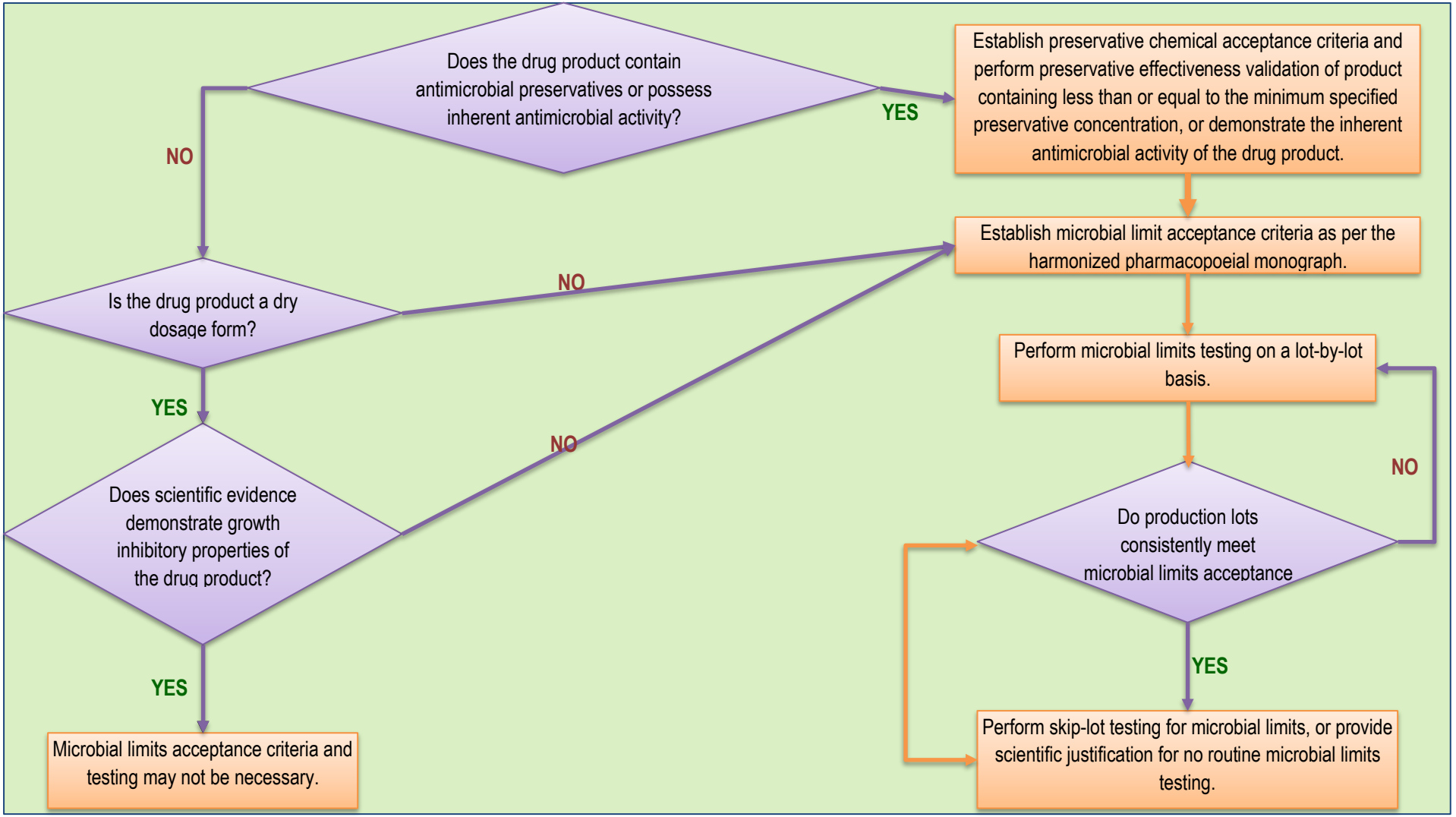


Figura 2: *Decision tree #6: Microbiological quality attributes of drug substances and excipients*

Figura 3: *Decision tree #8: Microbiological attributes of non-sterile drug products*



Bibliografía

1. ICH Q9 Quality Risk Management. Jan. 2006.

2. United States Pharmacopeia (USP) <1111> *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use.*

3. European Pharmacopoeia 5.1.4. *Microbiological Quality of Nonsterile Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use.*

4. Disposición Nº 7667/10 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de Argentina.

5. United States Pharmacopeia (USP) <1112> *Application of Water Activity Determination to Nonsterile Pharmaceutical Products.*

6. United States Pharmacopeia (USP) <51> *Antimicrobial Effectiveness Testing*

7. European Pharmacopoeia 5.1.3. *Efficacy of Antimicrobial Preservation*

8. Anthony Cundell. *Risk-based Apr-proach to Pharmaceutical Microbiology.* Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Ed: Michel Miller

9. WHO Technical Report Series No. 908.2003 Annex 7. *Application of Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Methodology to Pharmaceuticals*.

10. Robert A. Pietrowski. *Risk Management and Microbiological Auditing*. "Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices". Ed: Stephen Denyer and Rosamund Bair.

11. ICH Q6A – Decision tree #6 "Microbiological quality attributes of drug substance and excipients"; Decision tree#8 "Microbiological attributes of No-sterile drug products".

12. ICH Q8 – Pharmaceutical Development

Dedicatoria:

Dedico este capítulo a mis ex- colaboradores y compañeros que me han apoyado, a mis compañeros de la Subcomisión de Buenas Prácticas de la AAM. Y fundamentalmente a mi esposo Ricardo y mi hija Leonor, que constantemente me han alentado en el proyecto de esta 2da edición del manual.

Capítulo VI.6.

Incertidumbre de medición asociada a los resultados microbiológicos

Susana Carnevalli

Introducción

Variabilidad de las mediciones microbiológicas y sus fuentes.

Características de los resultados de los ensayos: exactitud (precisión, veracidad) y su expresión cuantitativa.

Enfoques en la estimación de la incertidumbre de medición de los ensayos cuantitativos.

Estimación de la incertidumbre de medición en otros métodos de ensayo.

Expresión de la incertidumbre de medición en los informes de ensayo.

1. INTRODUCCIÓN

Las mediciones microbiológicas ocupan un lugar relevante en numerosas actividades, en las cuales se analizan muestras ambientales, clínicas, de alimentos para consumo humano y animal, medicamentos y productos cosméticos, cuyo objetivo es, entre otros, el diagnóstico, la identificación del agente causal de un brote de enfermedad transmitida por alimentos, el cumplimiento con criterios microbiológicos o la realización de una evaluación de riesgos microbiológicos. La toma de decisiones, que en muchos casos conducen a estimar un riesgo para la Salud Pública, se basa en los resultados de estas mediciones, para lo cual es necesario interpretar su significado en el cumplimiento de límites, especificaciones y de evaluaciones de riesgo.

Por ello los resultados deben ir acompañados de una indicación de su calidad y de su confiabilidad y, por lo tanto, de su incertidumbre.

Pero ¿qué es la incertidumbre de medición? El Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) (1) define a la incertidumbre como un "parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza". El mensurando, según el VIM, es la cantidad que se intenta medir, la cual es la propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia. Interpretando esta definición en cuanto a su significado en el contexto de los ensayos microbiológicos, el mensurando o magnitud a medir por el método de ensayo utilizado es la cantidad del analito[1], por ejemplo en un ensayo de enumeración de aerobios totales, será el número de ufc por la unidad de cantidad de muestra (ufc /ml o ufc /g).

Cuando se realiza la determinación de aerobios mesófilos totales en una muestra de agua, el resultado que se obtiene no estaría completo si no se incluye una indicación de la incertidumbre, es decir, del rango probable de valores que puede obtenerse de esa medición, dentro del cual se sitúa el valor medido. Una medida de la incertidumbre, para los datos cuantitativos, puede ser por ejemplo, una desviación estándar, denominada incertidumbre de medida estándar (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado (1).

[1] **Analito**: componente representado en el nombre de una cantidad mensurable. En microbiología, significa un microorganismo, grupo de microorganismos o sus productos (por ejemplo toxinas) cuantificado o detectado por el método de análisis. Posibles objetivos de las técnicas que se utilizan para la detección o enumeración del analito puede ser ADN / ARN, proteínas, lipopolisacáridos u otros (2).

Por lo tanto, la incertidumbre indica la calidad de la medición y el grado de conocimiento que se tiene de la magnitud a medir.

Vale aclarar, que la incertidumbre de una medición no implica duda sobre la validez de la misma, sino por el contrario, el conocimiento de la misma expresa cuál es el grado de confianza que se puede tener en la validez de esa medición, añadiéndole un valor al resultado. También es importante para que el laboratorio conozca la calidad de sus mediciones y pueda mejorarla teniendo en cuenta las fuentes o componentes que contribuyen a esa incertidumbre.

Por ello este capítulo se propone mostrar, para comprender cuál es el significado del concepto de "incertidumbre" en el campo de los análisis microbiológicos, las fuentes de variabilidad asociadas, las características de los resultados de los ensayos y su expresión cuantitativa y finalmente proponer una forma práctica en que los laboratorios pueden llevar a cabo el cálculo de la incertidumbre de medición para sus ensayos microbiológicos cuantitativos y expresar la incertidumbre relacionada a sus ensayos cualitativos.

2. VARIABILIDAD DE LAS MEDICIONES MICROBIOLÓGICAS Y SUS FUENTES

Los ensayos microbiológicos, ya sea para la detección de microorganismos o la enumeración de éstos en las muestras, involucran una serie de operaciones que introducen variabilidad en los resultados y por consiguiente contribuyen a la incertidumbre de medición. Corry y col.[3] realizan una revisión crítica de la incertidumbre de medición de los métodos de enumeración de microorganismos en alimentos e incluyen una extensa descripción de aquellas fuentes asociadas a la variabilidad de los resultados, que todo microbiólogo, cualquiera sea su área de aplicación, puede reconocer dentro de su trabajo diario. Estas fuentes [3,4,5], como se muestra en la Figura 1, son:

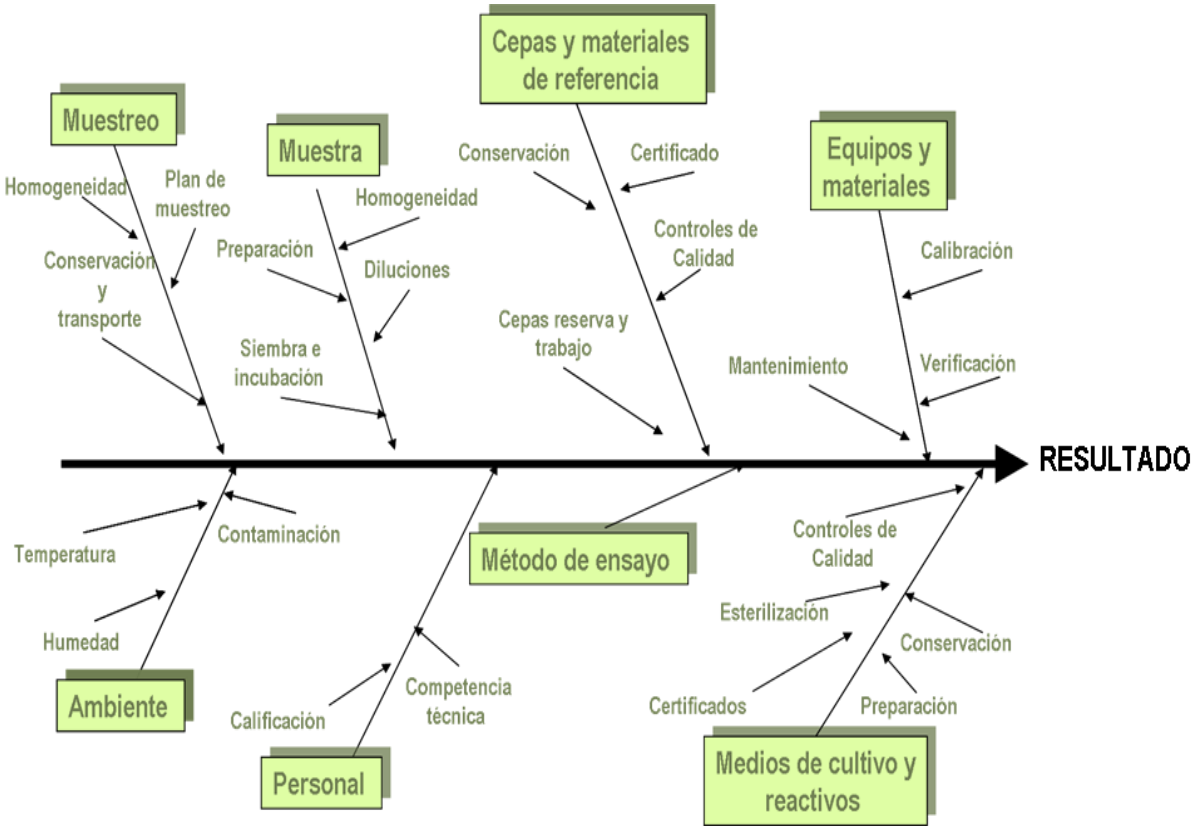


Figura 1 *- Fuentes de incertidumbre*

➢ Muestreo: naturaleza y homogeneidad de la muestra original; concentración y calidad de flora acompañante; tiempo, transporte y condiciones de almacenamiento entre el muestreo y el ensayo; y método de muestreo.

- Muestra, existen diferentes factores que contribuyen a la incertidumbre tales como:
  - almacenamiento inadecuado;
  - porción de ensayo utilizada en el análisis de las sub-muestras;
  - distribución no uniforme de los microorganismos entre sub-muestras o porciones analíticas.
  - En la homogeneización de la muestra hay varios factores a considerar como, el grado de heterogeneidad de las suspensiones hechas a partir de la muestra; agrupamiento de microorganismos; distribución desigual de los microorganismos; mezclado insuficiente.
  - Diluciones: exactitud en la medición de volúmenes o en el pesado de las muestras (por ejemplo al hacer la 1º dilución); volumen del líquido de dilución utilizado; elección de dilución para recuento (una dilución o más que una dilución); grado de mezclado en cada etapa de las diluciones; número de etapas en la serie de diluciones; uso apropiado del equipo de dilución; volumen de la pipeta utilizado; adhesión de los microorganismos a la pipeta. La preparación de la primera dilución es muy importante ya que puede tener un considerable impacto en la población microbiana de la muestra, lo que se debe a los cambios en las características físico químicas de la suspensión en comparación con las de la matriz del producto. En esta etapa y dado que los microorganismos necesitan un período de recuperación antes de iniciar el crecimiento, cualquier daño a las células microbianas puede aumentar el período de latencia y alargar el período de incubación, lo cual impacta en los resultados finales y debe tenerse en cuenta durante el análisis, ya que si se acorta puede producirse una reducción de los recuentos o la aparición de falsos negativos en las pruebas de detección [(6)].
  - Siembra y condiciones de incubación: volumen del inóculo; duración, temperatura, humedad y condiciones atmosféricas durante la incubación, así como también la altura de las pilas de placas de Petri en la estufa de incubación; y condiciones de incubación inadecuada.

- Ambiente: efecto de las condiciones ambientales sobre el proceso de medición, o medición imperfecta de las condiciones ambientales; o desconocimiento de los efectos que éstas ejercen en el proceso de medida.

- Personal: sesgo personal en la lectura de instrumentos; competencia técnica de los analistas que ejecutan el ensayo. Aquí puede haber diferencias en todas las etapas de procesamiento de las muestras, la operación de los equipos y la lectura de los resultados ya sea cuali o cuantitativos. En este caso puede haber dificultades debido a la capacidad del analista de diferenciar entre colonias típicas y no típicas. También puede haber variación entre los distintos analistas o en un mismo analista. La diferencia entre analistas puede estar asociada a factores humanos, como las diferencias en la capacidad de aprendizaje. También puede haber variaciones debidas a la diversidad técnica entre los laboratorios. De allí la importancia de estudios colaborativos

- Equipos y materiales: resolución de los instrumentos, tolerancias; precisión de la balanza o de los equipos volumétricos; errores en la escala; valores asignados a los estándares (de referencia y de trabajo); cambios en las características o desempeño de un instrumento desde la última calibración; factores de corrección de calibración no aplicados.

- Medios de cultivo y reactivos: calidad de las materias primas; pesada exacta de los materiales; calidad del agua, incluido el pH y la conductividad; errores personales en la preparación de medios y en el uso de los mismos (por ejemplo, temperatura inadecuada cuando se agrega algún suplemento); autoclavado y control; mezcla adecuada; grado de humedad del medio sólido; desempeño del medio tales como selectividad y especificidad; vida media. También son importantes factores a tener en cuenta, el equipo utilizado en la dispensación de los medios, la temperatura de conservación del medio fundido, entre otros.

➢ Método de ensayo: aquí se conjugan varios de los factores que se mencionaron anteriormente, dado que el verdadero nivel de contaminación microbiana de una muestra es desconocida y los números de microorganismos que se detectan por un determinado método dependen de las características intrínsecas del propio método analítico. La elección del método, su robustez, sensibilidad, especificidad y recuperación son importantes factores que afectan la incertidumbre. Puede suceder que se adopte un método en el cual haya una incompleta definición del ensayo, por ejemplo no está definido el rango de incubación; el medio de cultivo no permite una adecuada recuperación del microorganismo, introduciendo un sesgo al método; los medios de enriquecimiento no son los adecuados para el tipo de matriz o el estado fisiológico de los microorganismos; el método de enumeración, la interpretación de las colonias o el método de confirmación no es apropiado o está insuficientemente definido; entre otros.

Resumiendo y de acuerdo a lo considerado previamente, son muchos los factores que afectan el resultado de un ensayo microbiológico. Para algunos, tales como los efectos de dilución, pipeteo, recuento, errores de pesada, se pueden elegir modelos matemáticos que expresen y cuantifiquen su contribución a la incertidumbre, pero para otros es difícil hacer una estimación correcta de su contribución. La comprensión de todos estos factores por el microbiólogo y su significado en el contexto de la estimación de la incertidumbre de medición, es fundamental a la hora de decidir qué enfoque adoptar para calcularla.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de determinar la incertidumbre es obtener un rango probable de valores, que se expresa junto al resultado, dentro del cual se sitúa el valor medido. El laboratorio debe tratar de mantener ese rango tan estrecho como sea posible, controlando las fuentes de variabilidad asociadas a: su infraestructura, los equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo, su personal y los métodos de ensayo.

Es por ello que antes de emprender cualquier estimación de la incertidumbre de medición para los ensayos que realiza, el laboratorio debe identificar las fuentes de incertidumbre asociadas al método de ensayo y especificar cómo las controla. Esto implica tener un sistema de aseguramiento de la calidad de modo de minimizar las variabilidades inherentes a todo proceso analítico.

Antes de describir los diversos enfoques sobre la estimación de la incertidumbre de medición en los métodos microbiológicos cuantitativos y los criterios para los ensayos cualitativos, es necesario realizar una corta introducción a las características de los resultados de estos ensayos en cuanto a su exactitud, (precisión y veracidad) y la forma de expresarlos cuantitativamente.

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS: EXACTITUD, (PRECISIÓN, VERACIDAD) Y SU EXPRESIÓN CUANTITATIVA.

Las determinaciones microbiológicas, al igual que las físicas o químicas, no son perfectas y sus resultados están asociados a diversas fuentes error. Éstos pueden provenir de efectos sistemáticos o efectos aleatorios. Los errores aleatorios son aquellos componentes del error que varían de forma imprevisible, y como menciona Jarvis[7] pueden estar asociados, entre otros, a la distribución de los microorganismos en la muestra original y en la porción analítica, a errores en la formulación de los medios de cultivo; mientras que los errores sistemáticos, que varían de forma previsible, están asociados generalmente con los equipos y los procedimientos.

Las fuentes de variabilidad, referidas anteriormente en este capítulo, tienen impacto en la calidad de los resultados y afectan la exactitud de los mismos.

Según la define el VIM [1], la exactitud de medida es "la proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando", e incluye los conceptos de veracidad[2] y precisión[3]. La veracidad se expresa habitualmente en términos de sesgo o *bias* y la precisión se expresa numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la

[2] **Veracidad**: proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia [1]. El verdadero valor de una cantidad es un concepto teórico y, en general, no puede ser conocido exactamente. En la práctica el valor de referencia aceptado puede sustituir al valor verdadero.

[3] **Precisión**: proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas [1].

desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas. Las "condiciones especificadas" pueden ser condiciones de repetibilidad[4], condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad[5]. La reproducibilidad y la repetibilidad, son dos medidas de precisión extremas, dado que en la primera se obtiene la mayor variabilidad de los resultados, al variar todos los posibles factores, incluido el laboratorio, y la segunda proporciona la menor variabilidad.

La precisión intermedia (1) es la precisión de medida bajo un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo laboratorio y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones. Las variaciones pueden comprender nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que involucren variaciones y las que no. Tal como se verá más adelante la precisión intermedia es uno de los modelos recomendados para estimar la incertidumbre de medición en los ensayos microbiológicos cuantitativos.

Retomando el concepto de exactitud, se puede decir que ésta significa la "ausencia de error". Cuánto más exacta sea una medición, menor será el error de medida y en consecuencia un resultado es exacto cuando al mismo tiempo es veraz (ausencia de errores sistemáticos) y preciso (ausencia de errores aleatorios). Esta es una situación ideal ya que se sabe que ninguna medición es perfecta y como la exactitud es un concepto cualitativo o teórico, su expresión cuantitativa o numérica es la incertidumbre de medición. En la Figura 2 se aprecian las expresiones cuantitativas de los conceptos mencionados anteriormente.

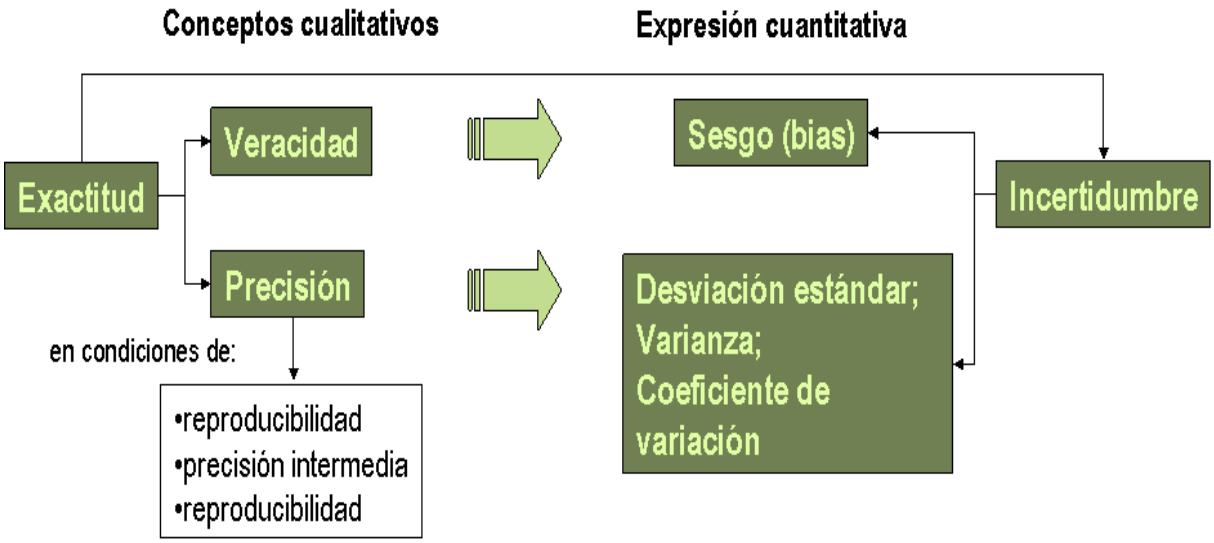


***Figura 2** - Conceptos de precisión, veracidad y exactitud y su expresión cuantitativa.*

Con respecto al sesgo, dada la naturaleza empírica[6] de los métodos utilizados, donde es el procedimiento de análisis y las condiciones definidas en él, tales como temperatura y tiempo de incubación, medios de cultivo utilizados, entre otros, el que determina directamente el resultado de la medición, por ejemplo, el número de

[4] **Repetibilidad**: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad. Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo (1).

[5] **Reproducibilidad**: precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad. Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no (1).

[6] **Método empírico**: es un método que determina un valor al que sólo se puede llegar en términos del método en cuestión y que, por definición, sirve como el único método para establecer el valor aceptado del parámetro medido (8). Un método de ensayo diferente (a menudo para el mismo analito) puede dar un resultado diferente, dado que el mensurando se define en los términos del método.

unidades formadoras de colonias por unidad de muestra no es posible en la práctica determinar el valor real, que se requiere para determinar el sesgo.

La utilización de materiales de referencia certificados, cuyo valor se obtiene también de métodos empíricos, y/ o los valores derivados de la participación en Ensayos de Aptitud, constituyen una herramienta útil para demostrar la competencia del laboratorio, pero sólo cuantifican una parte del sesgo total. Estas herramientas permiten demostrar que el sesgo se encuentra bajo control.

4. ENFOQUES EN LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN DE LOS ENSAYOS CUANTITATIVOS

Frente a la necesidad de cumplir con los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025 [9], en el marco de la acreditación de laboratorios de ensayos, se han publicado varios documentos, algunos elaborados por organismos de acreditación, donde se proponen diferentes modelos para estimar la incertidumbre asociada a los resultados de los ensayos microbiológicos. Estos documentos analizados por Corry y col.[3], comprenden entre otros los publicados por el Servicio de Acreditación del Reino Unido (UKAS) y una guía para el cálculo y la expresión de la incertidumbre en las mediciones microbiológicas publicado en 2003 por el Centro de Metrología y Acreditación de Finlandia [10]. En alguno de ellos se adopta el modelo "componente por componente" ("*bottom–up*"), propuesto originalmente en la Guía para la expresión de la incertidumbre en medición (*Guide to the expression of uncertainty in measurement* -GUM), publicada por ISO[7] en 1993 y en otras publicaciones, tales como la guía EURACHEM / CITAC para química analítica [11]. Este enfoque consiste en identificar y cuantificar cada uno de los componentes de incertidumbre del proceso de medida, los cuales son evaluados antes de combinarlos en un valor global que es la incertidumbre estándar combinada. Este modelo fue discutido, como expone muy bien Lombard en su artículo [12], en el seno del Comité de Microbiología de la ISO, debido a que para aplicarlo es necesario construir un modelo representativo del proceso de medida que contemple cada fuente asociada. Dada la complejidad de los ensayos microbiológicos de recuento, ya mencionada anteriormente, existen fuentes que no se pueden cuantificar o que es muy posible que no se tengan en cuenta en dicho modelo, por lo que es muy probable que se subestime la incertidumbre. Por ejemplo, se podrían dejar de lado las fuentes asociadas al sub-muestreo o toma de la porción analítica, que en microbiología de alimentos, debido a la heterogeneidad de la matriz, pueden constituir una de las fuentes más importantes. Recientemente, el Comité TC 147/SC 4 - *Microbiological Methods* de la ISO, elaboró la Norma ISO 29201:2012, Calidad del agua – "La variabilidad de los resultados de ensayo y la incertidumbre de medida de métodos de enumeración microbiológicos"[13], que propone dos enfoques para la estimación de la incertidumbre de medición: uno por componentes y otro global, este último basado en el análisis estadístico de una serie de observaciones repetidas del resultado final.

Se discuten a continuación los diferentes modelos para la estimación de la incertidumbre de medición.

4.1 Precisión intermedia

Este enfoque utiliza la información generada durante las actividades que llevan a cabo los laboratorios como parte de su programa de Aseguramiento de la Calidad. En microbiología se puede esperar que la precisión constituya la contribución dominante a la incertidumbre de medición[14], y puede determinarse de una manera práctica, mediante la utilización de datos experimentales como los surgidos del análisis de replicados durante las actividades de control de calidad. Cuando, para un método en particular y determinados tipos de muestras, se recogen a lo largo del tiempo los datos surgidos de ensayos duplicados, por ejemplo, teniendo en cuenta todas las posibles fuentes de variación dentro del laboratorio, se puede determinar una desviación estándar de precisión intermedia, tal como propone la norma ISO 5725-3 [15] y que se calcula a través de la siguiente fórmula:

[7] **ISO**: Organización Internacional para la Estandarización (ISO de su acrónimo en inglés International Organization for Standardization)

$$s = \sqrt{\frac{1}{2t}\sum_{i=1}^{t}(y_{i1} - y_{i2})^2}$$

Donde:

(y_{i1}– y_{i2}) es la diferencia entre los resultados de los distintos duplicados

Σ (y_{i1} – y_{i2})^2 es la suma de los cuadrados de las diferencias entre cada conjunto de resultados duplicados

t es el número de muestras analizadas

Las condiciones de precisión intermedia permiten determinar la precisión del método de ensayo a largo plazo en el laboratorio, al variar factores tales como los operadores, los equipos, diferentes lotes de medios de cultivo, durante períodos largos, de semanas y meses, incorporando entonces la mayoría, sino todas, las fuentes de incertidumbre significativas.

Este enfoque es aplicable para estimar la incertidumbre en ensayos microbiológicos cuantitativos, cuando el recuento de los duplicados seleccionados para realizar la estimación se encuentra dentro del rango de recuento especificado en el método que se trate. Sin embargo, cuando se obtienen recuentos bajos o ningún recuento, ya sea en placa o por filtración por membrana, lo cual para una matriz particular y para un ensayo dado puede ser la regla, no es apropiado el cálculo de la precisión intermedia, dado que el coeficiente de variación (CV) aumenta rápida y significativamente cuando disminuye el recuento [16, 17].

Puede aplicarse a distintas matrices, como métodos de recuento para productos cosméticos, medicamentos, alimentos, agua, entre otros, tal como lo indican algunas publicaciones, entre ellas varias guías elaboradas por distintas entidades de acreditación, que proporcionan ejemplos [4, 5, 14, 16, 18, 19, 20].

4.2 La Norma ISO/TS 19036:2006 y su Amd1: 2009

Esta norma propone un modelo, que adopta un enfoque "*top-down*" o "global", basado en la variabilidad total del proceso de medición, cuya salida es el resultado del ensayo. Este enfoque se representa mediante el modelo de la caja negra ("*black box*"), tal como se muestra en la Figura 3, donde se identifican las principales fuentes de incertidumbre que pueden encontrarse en un ensayo microbiológico de enumeración de microorganismos.

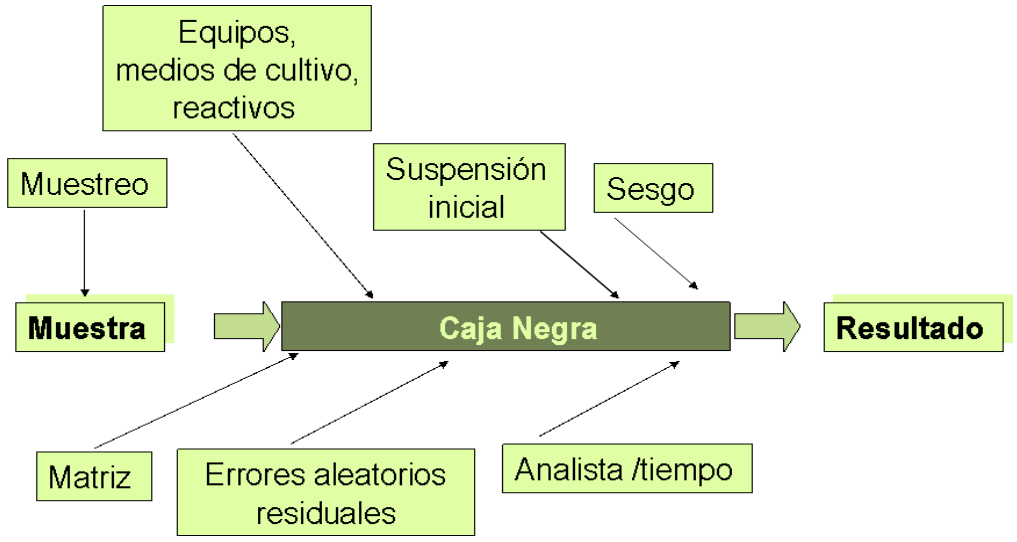


Figura 3 *- Diagrama de la Caja Negra (Fuente: ISO/TS 19036:2006)*

Tal como se observa en el diagrama, que es de utilidad para identificar las fuentes que son cubiertas según el protocolo experimental utilizado, el muestreo queda excluido del proceso de medición, dado que en la mayoría de los laboratorios éste comienza cuando la "muestra" es recibida en el laboratorio. También incluye otras fuentes

importantes de variabilidad del proceso analítico, tales como analistas, tiempo, equipos, medios de cultivos y reactivos, que fueron discutidos previamente en este capítulo. Los errores residuales aleatorios son aquellos no incluidos en los anteriores y que pueden evaluarse en condiciones de repetibilidad intralaboratorio.

La incertidumbre de medida (IM) se estima mediante un enfoque simplificado que toma en cuenta la distribución de Poisson y que puede aplicarse a cualquier resultado incluyendo bajos recuentos y/o bajo número de microorganismos.

Aplica a ensayos cuantitativos de productos destinados al consumo humano y la alimentación animal y, a muestras ambientales en el ámbito de la producción y manipulación de alimentos, donde la enumeración de microorganismos se lleva a cabo mediante técnicas de recuento de colonias. También es aplicable a ensayos cuantitativos llevados a cabo mediante métodos instrumentales. No es aplicable a la enumeración de microorganismos utilizando la técnica del Número Más Probable.

Esta norma, elaborada por el Comité Técnico ISO/TC 34/, subcomité SC9 Microbiología, y avalada por numerosas instituciones, entre ellas el Codex, surgió ante la necesidad de elaborar una Norma Internacional que proporcionara un enfoque adecuado, especialmente para aquellos métodos microbiológicos donde los resultados son obtenidos de matrices heterogéneas como las alimentarias y, que pudiera ser utilizada por los laboratorios con el fin de cumplir los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025, con propósitos de acreditación. Por otro lado, al contar con un documento armonizado se evitarían las dificultades que podrían surgir al comparar los valores de la IM obtenidos por distintos laboratorios para la misma determinación. Las posibles divergencias en estos valores podrían resultar de los distintos enfoques en la estimación de la IM y no de diferencias en el método de análisis o en la competencia de los laboratorios [12, 21]. El Amd.1:2009 contempla el caso para los recuentos bajos que no fue incluido en la edición 2006 por falta de consenso.

Debido a la simplicidad del enfoque, algunas entidades de acreditación y organismos oficiales tales como la Agencia Federal Belga para la Seguridad de la Cadena Alimentaria (FASFC) y la Agencia Danesa de Protección Ambiental en su guía para productos cosméticos, recomiendan en sus documentos su aplicación [5, 22, 23, 24, 25, 26, 27].

4.2.1 Incertidumbre combinada. Se considera que cuando los principales componentes de la incertidumbre están bajo control, lo cual es un requisito antes de emprender cualquier cálculo experimental, la incertidumbre estándar combinada $u_c(y)$ [8] es, la combinación de una incertidumbre estándar derivada de la precisión observable, en este caso la desviación estándar experimental de reproducibilidad (s_R) del resultado final de la medición, combinada con un componente debido a la distribución de Poisson y, cuando sea apropiado al sesgo o *bias*.

Para el cálculo de s_R, la norma propone tres posibilidades:

- la s_R intralaboratorio, un caso particular de "precisión intermedia" según lo definido en la ISO estándar 5725-3;
- la s_R interlaboratorio derivada de la validación del método;
- la s_R interlaboratorio derivada de ensayos de aptitud (EA).

Se tratará a continuación la primera opción, para la cual la norma específica los cálculos y recomienda su uso y posteriormente las ventajas e inconvenientes de utilizar las otras dos.

4.2.2 s_R intralaboratorio. Es la opción de preferencia, dado que la incertidumbre de medición estimada está asociada al laboratorio y determinada con los resultados obtenidos bajo condiciones definidas, por ejemplo y entre otros, distintos operadores, distintos equipos, contemplando así todas las posibles fuentes de incertidumbre que puedan encontrarse en las operaciones de rutina del laboratorio. Por lo tanto, la incertidumbre estimada no caracteriza al método analítico por sí mismo independientemente del laboratorio que lo implementa.

[8] **Incertidumbre estándar combinada (u_c)**: incertidumbre estándar de un resultado, cuando ese resultado es obtenido a partir de valores de otras cantidades, que es igual a la raíz cuadrada positiva de la suma de los términos, siendo estos términos, las varianzas o covarianzas de esas otras cantidades, ponderadas de acuerdo a como varía el resultado de la medición al variar esas cantidades. La incertidumbre estándar, u (x_i) es la incertidumbre del resultado x_i de una medición expresada como una desviación estándar [21].

¿Cuáles son las fuentes de incertidumbre cubiertas en este caso? Como se aprecia en la Figura 4, además de las fuentes de variabilidad mencionadas anteriormente en 4.2, se contempla la etapa de sub-muestreo a partir de la cual se toma la porción analítica utilizada en la preparación de la suspensión inicial, lo que es muy importante dada la distribución heterogénea de los microorganismos, especialmente en las matrices alimentarias. También tiene en cuenta el tipo de matriz ya que tiene un efecto relevante sobre la incertidumbre de medida. Sin embargo, excluye al muestreo por lo expresado anteriormente en 4.2. El sesgo no está cubierto por este protocolo debido a la naturaleza empírica de los métodos microbiológicos, donde el analito está definido por el método utilizado.

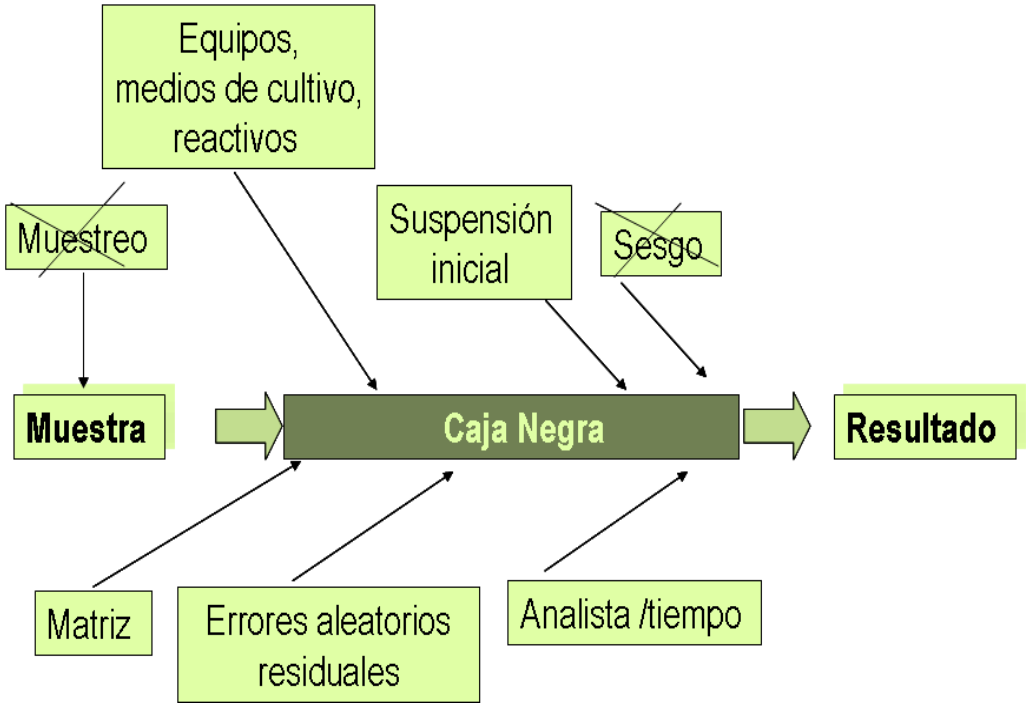


Figura 4 *- Fuentes de incertidumbre cubiertas por la determinación experimental de la s_R intralaboratorio (Fuente: ISO/TS 19036:2006)*

La s_R intralaboratorio debe ser calculada:

- para cada microorganismo, o grupo de microorganismos, por ejemplo enumeración de *Escherichia coli* en leche, enumeración de coliformes totales en quesos, recuento de aerobios mesófilos en carne picada.
- para cada tipo de la matriz, o grupo de matrices, y
- para cada método que el laboratorio utilice para producir sus resultados de rutina.

La Norma propone una clasificación de matrices, tal como se muestra en la Tabla 1, fundada en los resultados obtenidos en el interlaboratorio organizado por la AFSSA[9] (Francia), a pedido del comité 34/SC 9 de la ISO, en el período 2003-2004, y basada en características físicas de las matrices. La naturaleza de la matriz afecta la incertidumbre de medida a partir de dos fuentes principales: una ligada a su heterogeneidad y por consiguiente a la toma de la porción analítica, y otra a la preparación de la suspensión inicial.

[9] **AFSSA** : Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de los Alimentos (de su acrónimo en francés *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*).

Categorías	Tipo de Matriz
Categoría 1) líquidos y polvos	Leche, leche en polvo, etc.
Categoría 2) sólidos bien mezclados	Carne picada, salchichas, crema batida, helados, etc.
Categoría 3) sólidos pequeños o muy pequeños	Zanahorias ralladas, cereales, piensos, avellanas picadas, perejil deshidratado, champiñones, ensalada, langostinos, etc.
Categoría 4) otros sólidos	Pastelería, quesos, carne sin picar, etc.

Tabla 1 - *Categoría de matrices (Fuente: ISO/TS 19036:2006)*

El Laboratorio debe analizar, dentro de cada categoría, de las indicadas en la Tabla 1, muestras de diferentes matrices.

La selección del número y tipo de matrices[10] depende de la diversidad de matrices que analice rutinariamente el laboratorio, por lo tanto deben elegirse en función de su relevancia para el microorganismo para el cual se realiza el ensayo, de su representatividad en términos de IM, y/o cuando el laboratorio la considera crítica debido, por ejemplo, a la presencia de inhibidores, de flora competitiva, de tratamientos que puedan afectar o causar daños al/los microorganismo(s) buscado(s).

Por ello esta es la parte más desafiante del método ya que una elección inapropiada puede conducir a un cálculo de IM que no es real.

4.2.2.1 Protocolo experimental. Tal como se aprecia en la Figura 5, dos operadores en dos condiciones diferentes A y B, toman de una misma muestra de alimento la porción analítica y preparan la primera dilución, que luego es analizada tal como lo indica el método, obteniéndose así dos resultados para cada condición.

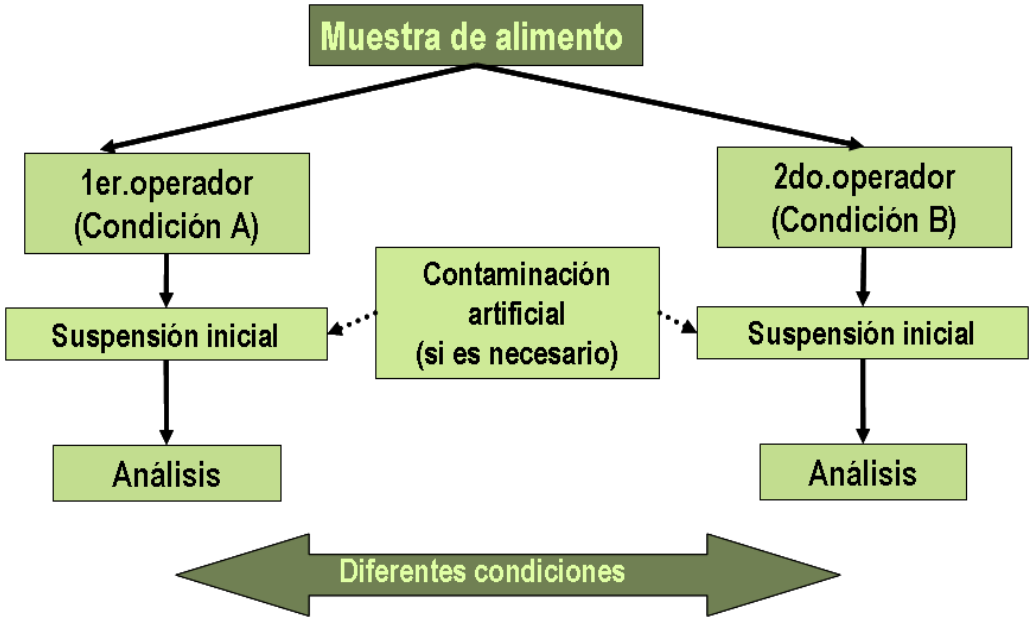


Figura 5 *- Protocolo para la determinación experimental de la s_R intralaboratorio (Fuente: ISO/TS 19036:2006)*

[10] Para la selección de las matrices, el laboratorio puede utilizar como orientación, los resultados detallados obtenidos del interlaboratorio que figuran en el Anexo A de la norma ISO/TS 19036:2006 y, además, el anexo A de la norma ISO 16140-2:2016 (28).

Este protocolo debe repetirse, para ese mismo método y microorganismo o grupo de microorganismos, por lo menos con 10 muestras por cada categoría de matriz. Es recomendable repetir el protocolo en días o fechas diferentes de manera de cubrir las variaciones en el funcionamiento del método a lo largo del tiempo.

Para tener en cuenta:

- Cada operador puede ser un analista o un conjunto de analistas, cada uno realizando una parte del procedimiento analítico.
- Las condiciones A y B deben ser tan distintas como sea posible de manera de cubrir todas las variaciones que puedan encontrarse en el día a día dentro del laboratorio. Por ejemplo, diferentes analistas, lotes de medios de cultivo, pipetas, balanzas, baños de agua, estufas, tiempo de análisis. Si la estabilidad de la muestra lo permite, las condiciones A y B pueden realizarse en diferentes días de análisis.
- Para obtener una estimación de la IM que caracterice adecuadamente la dispersión de los resultados obtenidos por el laboratorio en sus análisis de rutina, en lo posible, se deben seleccionar muestras naturalmente contaminadas, teniendo en cuenta el rango de trabajo y el tipo de muestras que se reciban habitualmente en el laboratorio. Esto se debe fundamentalmente a que el estado fisiológico del microorganismo, por ejemplo, condiciones de estrés debidas a procesos a la cual fue sometida la matriz, tales como refrigeración, salazón, pasteurización, pueden causar daños subletales a los microorganismos e influye en la variabilidad de los resultados. Por ello es importante la selección de matrices representativas (ver 4.2.2). Si se utiliza la contaminación artificial, debe realizarse de una manera controlada para no introducir elementos adicionales de variabilidad en los resultados. En estos casos la inoculación debe reflejar el hábitat natural de los microorganismos en la matriz, por ejemplo, presencia de flora acompañante, condiciones de estrés, entre otros.

El experimento debe ser diseñado de modo tal que se obtengan en todas las placas un número suficiente de colonias para ser utilizado en los cálculos.

- Si la suma del número de colonias obtenidas en todas las placas es menor que 10 ($\Sigma C < 10$), estos resultados deben excluirse de los cálculos.
- Si la suma del número de colonias obtenidas en todas las placas se encuentra entre 10-30 colonias, estos resultados pueden incluirse sólo si se espera que la desviación estándar de la reproducibilidad (s_R) a determinar, de acuerdo al método y para una determinada matriz, sea superior a 0,2 $\log_{10}$ (ufc / g) o 0,2 $\log_{10}$ (ufc / ml). De lo contrario deben excluirse y sólo tenerse en cuenta los resultados que arrojen una sumatoria de colonias mayor que 30 ($\Sigma C > 30$).[11]

Resumiendo:

Es fundamental cómo se diseñe la experiencia para la recolección de datos. Por ello se requiere:

- clasificar y caracterizar muy bien los distintos tipos de muestras que se analizan en el laboratorio y
- planificar adecuadamente la variación de los factores que afectan al proceso analítico para calcular la s_R Cada laboratorio conoce cuáles son esas condiciones, por ejemplo, épocas con gran cantidad de trabajo.
- operar bajo condiciones de aseguramiento de calidad, tanto interno como externo, de modo de demostrar que el método se encuentra bajo control y minimizar variabilidades. De este modo se asegura la validez de la estimación de la incertidumbre de medición para las actividades rutinarias del laboratorio y no solamente en un momento dado.

En general puede esperarse que la recolección de datos ocurra entre los 6 meses y 1 año, de modo de contemplar todas las fuentes de variabilidad posibles.

[11] **Nota**: esta limitación en el número de colonias se refiere únicamente a los datos incluidos en el cálculo de la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio y no a su aplicación para evaluar la incertidumbre de medición de nuevas muestras (21)

4.2.2.2 Cálculo de la s_R intralaboratorio. Una vez recogidos los datos y realizados los cálculos para obtener el resultado final, expresado en ufc/g o ufc/ml de acuerdo al método de ensayo utilizado, estos son transformados en sus logaritmos decimales, $\log_{10}$ (ufc/g) o $\log_{10}$ (ufc/ml). Esta transformación permite estabilizar la varianza de la reproducibilidad a través de los niveles de contaminación, siempre que los resultados basados en recuentos bajos no se utilicen en los cálculos.

Luego se calcula la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (s_R) para las *n* muestras analizadas de una determinada matriz, de la siguiente manera:

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

Donde:
y_{iA} y y_{iB} son los datos transformados logarítmicamente, expresados como $\log_{10}$ (ufc/g) o $\log_{10}$ (ufc/ml)
i es el índice de la muestra, i=1 a n (n ≥10)
A y B son las condiciones de reproducibilidad.

Se requiere una nueva estimación de la s_R después de cambios de cualquiera de los factores identificados como críticos, por ejemplo, cambio en los equipos, en los analistas, en los medios de cultivo, etc.

4.2.2.3 Cálculo de la incertidumbre expandida (U). Una vez obtenido la s_R, cada vez que el laboratorio analice una muestra y deba expresar la incertidumbre de medición para un resultado dado, deberá calcular la incertidumbre expandida (U)[12].
Para el cálculo de la incertidumbre expandida, U, se asume que el número de unidades formadoras de colonia en una placa de Petri, sigue la distribución de Poisson. Este componente aleatorio se toma en cuenta en la estimación de la incertidumbre expandida.
Si se indica el resultado del ensayo como *y*= $\log_{10}$ x, la incertidumbre expandida, U, con un factor de cobertura de 2 (correspondiente a un nivel de confianza del 95%), puede calcularse utilizando la ecuación:

$$U = 2\sqrt{{s_R}^2 + \frac{0{,}18861}{\sum C}} \quad (1)$$

Donde:

s_R es la desviación estándar de la reproducibilidad

0,18861/ΣC es el componente de la varianza debida a la distribución de Poisson, en la cual la sumatoria de C (ΣC) es la suma del número total de colonias contadas en todas las placas. El numerador deriva de la utilización de una propiedad de la distribución de Poisson donde la media es igual a la varianza, lo que conduce al cálculo del coeficiente de variación del componente de Poisson, CV=1/√ΣC, y a la aproximación de que el componente de la varianza de Poisson en una escala logarítmica es aproximadamente igual al coeficiente de variación al cuadrado, $(CV)^2$, cuando se usa una escala de logaritmos naturales. Por lo tanto cuando se utiliza una escala logarítmica decimal, $(\log_{10}e)^2 = 0{,}18861 \times (CV)^2$.

[12] **Incertidumbre expandida (U)**: cantidad que define a un intervalo en torno al resultado de una medición que puede esperarse que incluya una fracción grande de la distribución de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando (21).

Si bien la Norma en su Amendment 1:2009 recomienda que se utilice la fórmula (1) para mayor simplicidad, brinda la opción de simplificar los cálculos, si el Laboratorio considera, de acuerdo a la s_R obtenida y a la suma de colonias en todas las placas para la muestra analizada, que el componente de la varianza debido a la distribución de Poisson es despreciable. En ese caso el cálculo de la incertidumbre expandida, se reduce a la siguiente fórmula:

$$U = 2\,S_R \quad (2)$$

Para tomar la decisión de optar por la fórmula (1) ó (2), se debe calcular previamente un número de colonias límite (C_{lim}), de acuerdo a la siguiente fórmula, considerando que cuando $\Sigma C > C_{lim}$ la diferencia de U calculada según la fórmula (1) o (2) es despreciable (<5%):

$$C_{lím} = \frac{(\log_{10} e)^2}{S_R^2\ [(1-0{,}05)^{-2}-1]} \approx \frac{1{,}75}{S_R^2} \quad (3)$$

El valor de C_{lim} también puede obtenerse del Anexo B que figura en el Amendment de la Norma.

Pueden diferenciarse dos casos:

Si $\Sigma C > C_{lim}$ puede utilizarse la ecuación (2) para calcular U,

Si $\Sigma C \leq C_{lim}$ debe utilizarse la ecuación (1) para calcular U

Es muy conveniente utilizar una planilla de cálculos para cada método y dentro de éste para categoría de matriz, de manera de simplificar todas las operaciones.

Ejemplo. A continuación se presenta un ejemplo, que intenta ilustrar cómo realizar el cálculo de la s_R intralaboratorio y cómo calcular la incertidumbre expandida (U).

Un laboratorio utiliza para analizar distintas matrices alimentarias, el ensayo de enumeración de coliformes totales según la Norma ISO 4832:2006. Para las matrices cárnicas con las cuales trabaja habitualmente, carne vacuna, carne de cerdo y carne de pollo, diseñó un experimento para el cálculo de la s_R intralaboratorio. El laboratorio opera bajo un sistema de aseguramiento de la calidad y cuenta con dos analistas calificados. La experiencia se planificó de modo de recoger datos en un período de 5 meses, para efectuar el cálculo de la s_R intralaboratorio, teniendo en cuenta todas las posibles variaciones que se pudiesen encontrar durante los ensayos de rutina. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Muestra	Resultado A (ufc/g)	Resultado B (ufc/g)	Resultado A ($\log_{10}$)	Resultado B ($\log_{10}$)	$(A-B)^2/2$	$\Sigma(A-B)^2/2n$	s_R
1	260	220	2,41	2,34	0,0026	0,0220	0,15
2	33000	35000	4,52	4,54	0,0003		
3	437000	690000	5,64	5,84	0,0197		
4	7600	5400	3,88	3,73	0,0110		
5	440	500	2,64	2,70	0,0015		
6	450	250	2,65	2,40	0,0326		
7	1800	3900	3,26	3,59	0,0564		
8	3200	2100	3,51	3,32	0,0167		
9	800	1000	2,90	3,00	0,0047		
10	6800	15000	3,83	4,18	0,0590		
11	5100	6000	3,71	3,78	0,0025		
12	600	1300	2,78	3,11	0,0564	s_R=0,15 ($\log_{10}$)ufc/g	

Tabla 2. *Cálculo de la s_R intralaboratorio*

IMPORTANTE: para el cálculo de la s_R se trabaja con el resultado final del ensayo

Durante la rutina del laboratorio se pueden presentar estos dos casos:

a) se recibe una muestra de muslo de pollo y se obtiene el siguiente recuento:

(Dil. 10^{-1}): Placa 1: 120 ufc; Placa 2: 100 ufc

Resultado: 1100 ufc/g= 1,1 x10^3 ufc/g

Tomando logaritmos del resultado y= 3,04 [$\log_{10}$ (ufc/g)] C_{lim} =80

Como $\Sigma C > C_{lim}$ puede utilizarse la ecuación (2) para calcular U

$$\mathbf{U = 2s_R} = 0{,}30$$

El resultado podrá expresarse como:

1,1 x10^3 ufc/g [5,5 x10^2; 2,2 x10^3]

La Norma brinda otras opciones para la expresión de la incertidumbre de medida en los resultados que no se describen aquí.

b) se recibe una muestra de carne de cerdo y se obtiene el siguiente recuento:

(Dil. 10^{-1}): Placa 1: 10 ufc Placa 2: 12 ufc

Resultado: 110 ufc/g= 1,1 x10^2 ufc/g

Tomando logaritmos del resultado y= 2,04 [$\log_{10}$ (ufc/g)] C_{lim} =80

Como $\Sigma C \leq C_{lim}$ debe utilizarse la ecuación (1) para calcular U

$$\mathbf{U = 2\sqrt{0{,}022 + \frac{0{,}18861}{22}} = 0{,}35}$$

El resultado podrá expresarse como:

1,1 x10^2 ufc/g [4,9 x10; 2,4 x10^2]

4.2.3 Ventajas, inconvenientes y limitaciones de utilizar la s_R interlaboratorio derivada de la validación del método o de ensayos de aptitud (EA).

En ambos casos se cuenta con la ventaja de tener datos de precisión ya disponibles, que el laboratorio puede utilizar para estimar la incertidumbre de la medición bajo ciertas condiciones. Además, para aquel laboratorio que ha participado del interlaboratorio le posibilita evaluar su sesgo, que es parte del componente del sesgo que contribuye a la incertidumbre de medición.

En microbiología, si bien existen varias opciones de rondas de EA en las cuales el laboratorio pueda participar obteniendo así datos de precisión, hay pocos de estos parámetros derivados de estudios interlaboratorio de

validación de métodos de referencia microbiológicos, constituyendo esto una limitación para aplicar este protocolo. Otro inconveniente, es que los datos de precisión derivados de ensayos interlaboratorio han sido obtenidos en condiciones diferentes a las de la rutina diaria del laboratorio. Por ejemplo, en las rondas de EA, las matrices en muchos casos, son diferentes a las que analiza diariamente el Laboratorio y no tienen en cuenta la presencia de flora acompañante; las muestras distribuidas durante la ronda, han sido especialmente homogeneizadas y estabilizadas; los niveles de microorganismos en las muestras del EA, pueden no ser aquellos que el laboratorio analiza rutinariamente y pueden no cubrir el rango encontrado en el trabajo diario; en general, los laboratorios participantes, utilizan una variedad de métodos empíricos para obtener su resultado, empleándose valores de consenso para evaluar el resultado de la ronda.

Las fuentes de incertidumbre cubiertas por los dos protocolos de manera de obtener la s_R interlaboratorio son las que muestra la Figura 6.

Las condiciones bajo las cuales el Laboratorio puede utilizar los datos de precisión obtenidos del interlaboratorio, ya sea de validación del método o de su participación en el EA son las que muestra la Tabla 3:

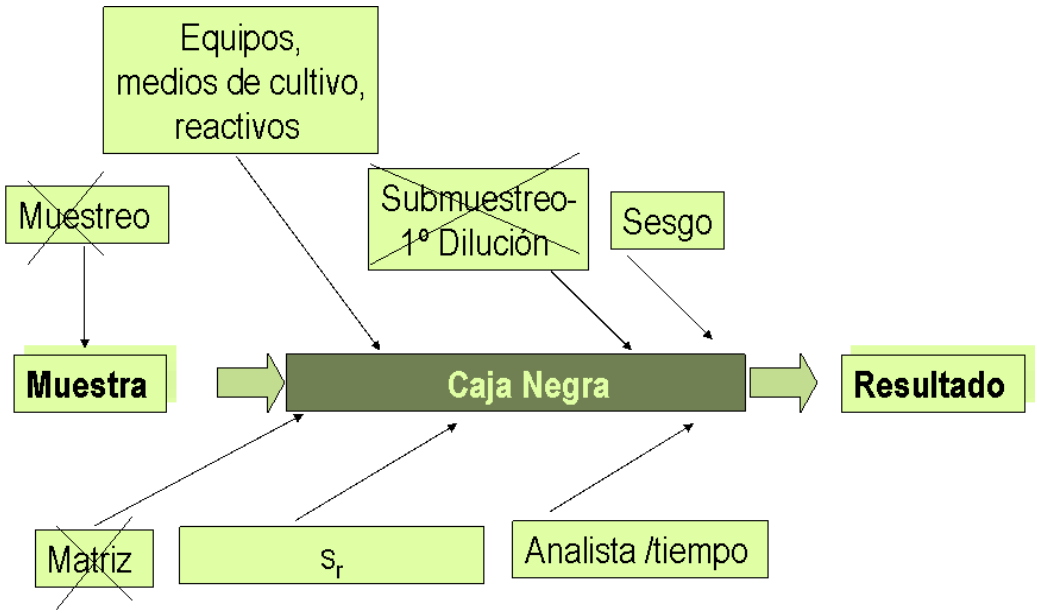


Figura 6 *- Fuentes de incertidumbre cubiertas por estos protocolos (Fuente: ISO/TS 19036:2006)*

Validación del método	Ensayo de aptitud
- El sesgo y la precisión del laboratorio deben ser compatibles con las del método validado. - En el estudio interlaboratorio se han contemplado todas las posibles fuentes de incertidumbre (especialmente la preparación de la muestra y la homogenización)	- En el EA, el laboratorio utiliza el mismo método que emplea para sus análisis de rutina. - Las muestras del EA deben ser comparables, en cuanto a matriz, microorganismos, nivel de contaminación, con las que analiza rutinariamente el laboratorio. - Los laboratorios que participan en la ronda no utilizan diferentes métodos empíricos o, un número suficiente de participantes utiliza el mismo método.

Tabla 3 - *Requisitos para utilizar datos de precisión derivados del ensayo interlaboratorio*

Para estimar la incertidumbre combinada con otros factores adicionales no incluidos en el estudio interlaboratorio, la norma remite a la norma ISO / TS 21748 [29].

4.3 La Norma ISO 29201:2012

4.3.1 Generalidades y fundamentos para el cálculo de la incertidumbre de medición.

Esta norma que, como se mencionó anteriormente, propone dos enfoques para la estimación de la incertidumbre de medición: uno global y otro por componentes, aplica a métodos de ensayos microbiológicos que se basan en la enumeración de partículas microbianas mediante cultivo. Esto comprende todas las variantes de los métodos de recuento de colonias. También aplica a la estimación del Número Más Probable (NMP). Este documento hace referencia a otras normas y guías, por ejemplo, ISO/TR 13843[17], ISO/TS 19036[21], Informe Nordtest TR 537[30], Procedimiento N° 8 NMKL[31], BS 8496[32], ISO 8199[33] y a dos publicaciones de Forster [14,16] de Nueva Zelanda y Niemelä [10] de Finlandia. Además, la norma proporciona ejemplos de aplicación para ambos enfoques en los respectivos anexos.

Tanto en el modelo global, como en el por componentes, para obtener la incertidumbre relativa combinada del resultado final, se combina la variabilidad operacional que tiene en cuenta todas las fuentes de incertidumbres asociadas a las etapas técnicas del procedimiento analítico y la variabilidad intrínseca (incertidumbre de la distribución) que está asociada con la distribución de las partículas en la suspensión final y en el instrumento de detección, a través de la siguiente fórmula:

$$U_{c,rel}(Y) = \sqrt{{U_{o,rel}}^2 + {U_{d,rel}}^2}$$

Donde:

$u_{c,rel}$ *(y) es la incertidumbre estándar combinada;*

$u_{o,rel}$ *es la variabilidad relativa operacional (incertidumbre estándar relativa experimental, determinada bajo condiciones de reproducibilidad intermedia);*

$u_{d,rel}$ *es la variabilidad intrínseca (incertidumbre relativa de la distribución).*

El cálculo de la incertidumbre de la distribución es el mismo para ambos esquemas, mientras que el de la incertidumbre operacional es diferente para cada uno de ellos.

El enfoque global que presenta la Norma, está constituido por un diseño experimental idéntico al de la norma ISO / TS 19036:2006, diferenciándose de ésta en los cálculos y en el número de muestras a analizar, que según la Norma, debe ser de al menos 30 y en lo posible naturalmente contaminadas, para reflejar la rutina diaria del laboratorio. La modificación en los cálculos permite aplicarla a muestras donde la variación de submuestreo es baja, como por ejemplo el agua y cuando los recuentos que se obtienen para determinada matriz y método son bajos.

4.3.2 Casos límites

La Norma además de proponer a sus usuarios una orientación para la elección del enfoque más adecuado, refiere a la norma ISO 8199 para la estimación de la incertidumbre del resultado del ensayo, en el caso de análisis de organismos indicadores directamente de muestras de agua por métodos de recuento de colonias, o sistemas de NMP, a los que considera casos límites. También podrían considerarse dentro de esta categoría, algunas muestras líquidas o finamente pulverizadas, especialmente cuando el recuento de colonias es bajo.

En estos casos, uno de los componentes, la variabilidad intrínseca, domina la incertidumbre combinada, por lo que es posible despreciar al componente más pequeño, la variabilidad operativa. La variabilidad intrínseca puede

estimarse a partir del resultado del ensayo, suponiendo distribución de Poisson u otras distribuciones, como propone la norma citada.

La norma ISO 8199:2005 propone el uso del intervalo de confianza al 95% para expresar el resultado de un ensayo (Cs), en muestras de agua, basado en la distribución de los microorganismos en dichas muestras siguiendo una distribución de Poisson.

Limitación: dicho intervalo no puede utilizarse en el caso de confirmación parcial de las colonias, dado que no sigue la distribución de Poisson.

El resultado de un ensayo (Cs), se expresa como el número unidades formadores de colonias (ufc)/ volumen de la muestra (generalmente 100 mL ó 1 mL), de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} V_s \quad (4)$$

Dónde:

Z: es la suma de colonias contadas en todas las placas o en las membranas, derivadas de las diluciones o volúmenes de la porción analítica.

Vs: es el volumen para expresar la concentración de microorganismos en la muestra.

V_{tot}: es el volumen de la muestra original incluido en las placas contadas.

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \cdots + (n_i V_i d_i)$$

Dónde:

$n_1, n_2, \ldots, n_i$: es el número de placas contadas por dilución $d_1, d_2, \ldots, d_i$.

$V_1, V_2, \ldots, V_i$: es el volumen utilizado con la dilución $d_1, d_2, \ldots, d_i$.

$d_1, d_2, \ldots, d_i$.: es la dilución utilizada para el volumen $V_1, V_2, \ldots, V_i$ (d=1 para una muestra sin diluir, d= 0,1 para una dilución al décimo, etc.)

Para el cálculo del intervalo de confianza al 95% a fin de expresar el resultado con su incertidumbre de medida, se distinguen dos casos, según el recuento sea mayor o menor a 20 colonias.

a) Cuando Z es ≥ 20 colonias, el resultado final con su intervalo de confianza es dado por:

$$C_s \pm IC95\% = \left[\frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{tot}}\right] V_s \quad (5)$$

Dónde: C_s es el resultado obtenido según la fórmula (4)

Ejemplo para recuento en placa. Se analiza una muestra de agua para el recuento de microorganismos cultivables de acuerdo a la norma ISO 6222:1999 obteniéndose los siguientes resultados:

Volumen sembrado	Recuentos
1 mL	12 y 16 colonias

Z= 12+16=28 colonias

V_{tot} = (2 x 1 x 1) = 2

$$C_s = \frac{28}{2} x1 = 14 ufc/mL \qquad \left[\frac{Z + 2 \pm 2\sqrt{Z+1}}{V_{tot}}\right] x V_s$$

Aplicando la fórmula (5), la expresión del resultado con su intervalo de confianza al 95% será:

$$14 \text{ ufc / mL}^{(9;19)}$$

b) Cuando Z es $<$ 20 colonias, se tiene en cuenta un factor de corrección para compensar la asimetría de la distribución de Poisson.

$$\text{Límites inferior y superior 95\%} = \left[\frac{Z+2\pm 2\sqrt{Z+1}}{V_{tot}}\right] xV_s \quad (6)$$

Ejemplo para filtración por membrana. Se analiza una muestra de agua para recuento de *Enterococcus* mediante filtración por membrana según ISO 7899-2:2000. Se filtraron 100 mL y se obtuvieron 10 colonias (Z). Aplicando la fórmula (6) la expresión del resultado con su intervalo de confianza al 95% será:

$$10 \text{ ufc / 100 mL}^{(5;19)}$$

5. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN EN OTROS MÉTODOS DE ENSAYOS

5.1 Ensayos que utilizan el Número Más Probable (NMP) para determinar el número de microorganismos en una muestra de ensayo. Para estos ensayos, tal lo expresado en el punto 2 de este capítulo, el laboratorio debe identificar las fuentes de incertidumbre y verificar que se encuentran bajo control. Al presente la posición de muchos organismos de acreditación [4,20,34], es que se pueden utilizar los límites de confianza de las tablas correspondientes para estimar la incertidumbre de los resultados, siempre que:

a) se identifiquen las combinaciones inusuales y se investiguen sus causas;

b) se demuestre que la precisión (determinada por ejemplo, mediante el análisis de duplicados) se encuentra dentro de dichos límites. Al respecto puede utilizarse el ejemplo propuesto por Forster[14].

La norma ISO 29201:2012[13], proporciona ejemplos del cálculo de la variabilidad intrínseca y de la variabilidad operativa, para métodos que utilizan el NMP, a través de los anexos, D, F y G, de modo de estimar la incertidumbre combinada del resultado del ensayo. Sin embargo se deben analizar una gran cantidad de muestras.

5.2. Métodos de ensayo microbiológicos cualitativos. Actualmente no se dispone de normas internacionales sobre la estimación de la incertidumbre de medición en los ensayos cualitativos, si bien se continúa investigando sobre la base de trabajos preliminares, cuyo común denominador es transformar datos cualitativos en cuantitativos. Estos se fundamentan en la cuantificación de las respuestas del ensayo en términos de un nivel estimado de detección, por ejemplo, el LOD_{50}, que es el valor del nivel de contaminación donde se obtiene un resultado positivo en el 50% de los casos. Este valor puede ser estimado por el método de Spearman-Karber o algún otro método alternativo. Otro enfoque es el de estimar la incertidumbre asociada con la proporción de muestras de ensayo que den una respuesta positiva, basada en la distribución binomial [3, 7, 12, 35].

El cálculo de incertidumbre de medición no es aplicable directamente a los resultados de los ensayos cualitativos. No obstante, dada la relevancia que tienen los métodos cualitativos en la detección de patógenos, y acorde a los requisitos de la norma ISO/IEC 17025 [9] es fundamental identificar y controlar las fuentes que afectan la incertidumbre de los resultados. Factores tales como la sensibilidad, especificidad y el límite de detección deben ser incluidos como componentes relevantes y sustanciales en la estimación de incertidumbre de estos métodos, y deben verificarse para establecer con que seguridad el laboratorio puede detectar un determinado microorganismo mediante la aplicación de un método particular [3].

Varios organismos de acreditación [4, 5, 20, 34] disponen en sus guías, que los laboratorios deben establecer la incidencia de resultados falsos positivos y falsos negativos asociada a los ensayos cualitativos que realizan. Esta

incidencia, expresada como Tasa de Falsos Positivos[13] y Tasa de Falsos Negativos[14], junto al límite de detección, puede determinarse durante la verificación o validación del método. La tasa de Falsos Positivos y Falsos Negativos no debe exceder las recomendaciones publicadas, ya sea en la literatura (normas o publicaciones relevantes al sector) o por los fabricantes, en este último caso para los métodos alternativos o de confirmación rápida (4).

6. EXPRESIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN EN LOS INFORMES DE ENSAYO

Cuando el cliente así lo requiera, el Laboratorio puede adoptar la expresión que crea más conveniente para informar la incertidumbre de medición asociada a sus resultados. En el informe, debe indicarse, o hacer referencia, al procedimiento empleado para el cálculo de la incertidumbre, ya que, de los diversos métodos utilizados, algunos, conducen a una subestimación significativa. Este procedimiento debe estar disponible para el cliente. También debe indicarse el nivel de confianza considerado y el factor de cobertura. En el Amd.1 de la Norma ISO/TS 19036, y en el Anexo N de la Norma ISO 29201, se dan las indicaciones para la expresión del resultado del ensayo y su incertidumbre asociada (13,21).

[13] **Tasa de Falsos Positivos** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad con que una muestra conocida como negativa, haya sido asignada como positiva por el método. La incidencia de falsos positivos es igual a: 1 menos la especificidad (3).

[14] **Tasa de Falsos Negativos** (para un tipo de matriz y un nivel de inoculación dado): es la probabilidad con que una muestra conocida como positiva, haya sido asignada como negativa por el método. La incidencia de falsos negativos es igual a 1 menos la sensibilidad (3).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oficina Internacional de Pesos y Medidas (BIPM). *International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM 3rd edition). JCGM 200:2012 (JCGM 200:2008 with minor corrections)*
2. ISO 16140-1:2016. *Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 1: Vocabulary*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
3. Corry, J.E.L; Jarvis, B.; Passmore, S; Hedges, A. *A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms*. Food Microbiol.; 24(3):230-53, 2007.
4. Canadian Association for Laboratory Accreditation (CALA). P19 – CALA Measurement Uncertainty Policy Revision 1.10. 2010
5. Singapore Accreditation Council (SAC). Technical Guide2. A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical & Microbiological Analysis. Second Edition, 2008.
6. ICMSF. Microorganismos de los Alimentos 7: *Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria.* Ed. Acribia, 2004
7. Jarvis B. *Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods*. Academic Press; 2 ed., 2008.
8. AOAC INTERNATIONAL. Términos y definiciones. Disponible en: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/aoac/AOAC_Member/PUBSCF/GARCF/TERMS_A.aspx
9. ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*.
10. Niemelä, S.I *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Publication J4/2003. Centre for Metrology and Accreditation (MIKES), Helsinki, Finland. 2003
11. Ellison, S.L.R; Williams, A (Eds). Eurachem/CITAC guide: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd ed. Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org
12. Lombard, B. *Estimation of measurement uncertainty in food microbiology*: The ISO approach. Accred Qual Assur., 17: 94–100, 2006.
13. ISO 29201:2012. *Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
14. Forster,L.I. *Measurement Uncertainty in Microbiology*. Journal AOAC. International. Vol 86.Nº5, 2003.
15. ISO 5725-3:1994. Accuracy *(trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
16. Forster.L.I. *Conclusions on Measurement Uncertainty in Microbiology*. Journal AOAC. International. Vol. 92, No. 1, 2009.
17. ISO/TR 13843:2000. Water quality -- *Guidance on validation of microbiological methods*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
18. Health Protection Agency (HPA). *Uncertainty of Measurement in Testing*. Guidance Note. QSOP 4. Issue no: 5, 2005.
19. South African National Accreditation System (SANAS). *Guidelines on Validation and Quality Assurance*. TG 28-02. 2008
20. International Accreditation New Zealand (IANZ). *Uncertainty of Measurement, Precision and Limits of Detection in Chemical and Microbiological Testing Laboratories*. AS TG5. 2004
21. ISO/TS 19036:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- *Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations / ISO/TS 19036:2006/Amd 1:2009. Measurement uncertainty for low counts.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
22. Dutch Accreditation Council. Explanatory Document on Microbiology. RvA-T002-NL. 2016.

23. Federal Agency for the Safety of the Food Chain – FASFC. *Microbiology – Estimating measurement uncertainty in microbiological testing*. LAB P 507. 2009

24. American Association for Laboratory Accreditation (A2LA).G108 - *Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods*. 2014.

25. Danish Ministry of the Environment. Environmental Protection Agency. *A guidance document on microbiological control of cosmetic products*. Environmental Project No. 1336, 2010

26. National Association of Testing Authorities, Australia (NATA). Biological Testing ISO/IEC 17025 Application Document. 2013

27. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). *Criterios Específicos de Acreditación. Análisis microbiológico. CEA-ENAC-20 Rev. 1. 2017*.

28. ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: *Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

29. ISO 21748:2017. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

30. Magnusson, B.; Näykki, T.; Hovind, H.; Krysell, M. Nordtest Report TR 537. *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories.* Edition 3.1, Espoo: Nordtest, 2012. 46 p.

31. Nordic Committee on Food Analysis (NMKL). *Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods*. Procedure No. 8, Version 4, 2008

32. BS 8496:2007. *Water quality – Enumeration of micro-organisms in water samples – Guidance on the estimation of variation of results with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement*.

33. ISO 8199:2005. *Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*.

34. Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation (APLAC). *Interpretation and guidance on the estimation of uncertainty of measurement in testing*. APLAC TC 005. Issue No. 4. 2010.

35. AOAC INTERNATIONAL *Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology*. BPMM Task Force Final Report. 2006.

Capítulo VI.7.

Capacitación y Entrenamiento

Patricia Domínguez

Introducción

Requerimientos

Programa de Entrenamiento efectivo

Implementación del Programa

Conclusiones

Referencias

Introducción

La Capacitación y el Entrenamiento del personal es quizás la herramienta más poderosa que se tiene para lograr los resultados deseados dentro del funcionamiento de un laboratorio o planta farmacéutica.

Es imprescindible contar con un buen programa de entrenamiento y supervisión del cumplimiento del mismo, no solamente por aspectos regulatorios y de GMP, sino porque el éxito de la gestión de un sector depende casi exclusivamente de ello.

El tipo de entrenamiento del personal que trabaja en un laboratorio de microbiología es muy específico y por ende así debe ser considerado.

Para muchos, el trabajo en un laboratorio de microbiología es considerado un tipo de *expertise* que tiene que ver más con un trabajo artesanal, paciencia, dedicación y hasta se puede incluir un cierto grado de pasión por esta especialidad que a veces es difícil encontrar en otros campos de la industria.

Trabajar con microorganismos puede ser muy tedioso o aburrido para el que no está interesado. Por eso, si bien el entrenamiento es muy importante es esta disciplina, más aún lo es la dedicación y el interés por ser un buen microbiólogo.

Cuando se combinan una muy buena y profunda capacitación con el deseo de ser especialista en el tema, se logra la combinación perfecta para poder llevar a cabo una gestión impecable.

Requerimientos

Se pueden establecer distintos tipos de requerimientos que nos llevan a cumplir con distintas necesidades de capacitación como ser:

- ✓ Perfil del personal
- ✓ Regulatorios
- ✓ Internos de la Compañía
- ✓ Especiales del laboratorio de Microbiología
- ✓ Otros Complementarios

A continuación se describe cada uno de ellos:

Perfil de personal:

El nivel de entrenamiento en el área de Microbiología dependerá de si se trata de personal que va a trabajar dentro del laboratorio realizando controles microbiológicos o si se trata de personal de planta.

El personal de calidad que trabaja dentro del laboratorio de microbiología deberá tener una formación acorde y un nivel de entrenamiento mayor y más específico.

El personal de planta, también se deberá distinguir según el área productiva en la que se desempeñe. No es lo mismo un área de sólidos que un área estéril de fabricación de inyectables. El personal de planta debe tener conocimientos de higiene, posibles contaminaciones y cuál es el impacto de sus acciones desde el punto de vista microbiológico. El personal del área aséptica deberá recibir un entrenamiento más crítico.

Regulatorios

Hoy en día las exigencias regulatorias han cobrado mucha importancia. En todas las regulaciones tanto locales como internacionales se menciona la mandatoriedad de la capacitación y entrenamiento del personal. Por ejemplo:

Disposición 2819/2004 de Salud pública de Argentina
WHO *(World Health Organization*)
PICs *(Pharmaceutical International Convention*)
CFR (*Code of Federal Regulations*)
USP Chapter: 1117 - *Microbiological Best Laboratory Practices*

En este último capítulo de la USP (*United States Pharmacopeia*) se hace referencia especialmente a la capacitación en un laboratorio de microbiología a diferencia de las otras regulaciones que se refieren a la capacitación GMP en general.

La USP destaca:

- ✓ la importancia del microbiólogo en el laboratorio farmacéutico.
- ✓ recomienda la utilización de procedimientos estándar de operación como base para el entrenamiento del personal y para demostrar su eficiencia
- ✓ recomienda la evaluación periódica del desempeño en actividades básicas tales como plaqueo, técnicas asépticas, coloraciones, etc.
- ✓ para los supervisores del laboratorio especifica un entrenamiento en investigaciones de laboratorio, procesos de manufactura, técnicas de supervisión como conducción y liderazgo entre otros temas.

Internos de la Compañía

Cada Empresa Farmacéutica tiene sus propias normas que generalmente están basadas en normas GMP internacionales que deben cumplirse y por ende el personal debe estar capacitado en ellas. Entre estas normas destacamos:

- ✓ Normas propias de GMP – Higiene en general
- ✓ Exigencias en cuanto a Seguridad y Protección ambiental
- ✓ Prevención de accidentes
- ✓ Bioseguridad
- ✓ Manejo de residuos. Sobre todo en el caso del laboratorio de Microbiología son importantes los que se consideran patológicos.

Dentro de estos requerimientos internos variaran según de que personal se trate. Podemos definir: 1) Personal de Microbiología - Perfil del puesto; 2) Personal externo; y 3) Personal de Planta

1) *Personal de Microbiología- Perfil del puesto*

La capacitación dependerá de los requisitos según el perfil del puesto. En el laboratorio de Microbiología podemos tener distintos perfiles como, por ejemplo:

Técnico que prepara y esteriliza medios de cultivo
Analista
Supervisor- Microbiólogo
Coordinador/ Jefe responsable del sector, también Microbiólogo

Todo esto dependiendo de la estructura y complejidad del laboratorio o de la Compañía.
También dentro de esta categoría se incluye la Calificación del personal en cuanto a sus estudios de grado y post grado, experiencia previa en el área y la educación continua en cuanto a las sucesivas actualizaciones dentro de la especialidad.

2) *Personal externo:*

Se refiere a personal que no trabaja habitualmente en el laboratorio como el personal de los sectores de Ingeniería que puede entrar a realizar algún mantenimiento preventivo o correctivo. Personal de limpieza que muchas veces es externo a la empresa y proveedores de equipos o insumos. En este último caso deben recibir una capacitación en normas básicas de higiene, vestimenta y normas de seguridad. También capacitación en su área específica y en bioseguridad como mínimo.

3) *Personal de Planta:*

En este caso se incluye al personal que no trabaja en el laboratorio de Microbiología pero sí dentro de una planta farmacéutica que deberá recibir capacitación en normas de higiene, conceptos de contaminación y microbiología básica.
Cabe mencionar especialmente al personal que trabaja en área aséptica donde estos conceptos deberán ser más profundos que el resto de la planta, contando con entrenamiento más exhaustivo

<u>Especiales del Laboratorio de Microbiología</u>

En este sector se debe capacitar a su personal en conceptos específicos que hacen a la especialidad y que son de fundamental conocimiento para quien debe trabajar en el área de Microbiología.

Conceptos de contaminación
Técnicas asépticas
Técnicas de esterilización
Manejo e identificación de microorganismos
Manejo de medios de cultivo incluyendo su control de calidad
Técnicas de monitoreo ambiental
Métodos de control microbiológico y su validación
Calificación, uso y mantenimiento de distintos tipos de equipos como autoclaves, estufas, cabina de seguridad biológica

<u>Otros Complementarios</u>

Como otros requerimientos que hoy en día no pueden estar ausentes en cualquier persona que se desempeñe en un laboratorio de la industria farmacéutica podemos enumerar los siguientes que hoy por hoy son mandatarios:

Manejo de herramientas informáticas- LIMS
Métodos estadísticos- Análisis de tendencias
Manejo de desviaciones y controles de cambio
Control de gestión del laboratorio
Sistema de Calidad
Indicadores de performance-KPIs
Actualizaciones en la especialidad
Idiomas

Programa de Entrenamiento Efectivo

Generalidades

Es fundamental poder desarrollar un programa de capacitación y entrenamiento lo más efectivo posible, ya que el objetivo principal del mismo es mantener un adecuado sistema de calidad. Para ello se deben enfrentar determinados desafíos inherentes a lo que se refiere al entrenamiento en sí mismo.

Dentro de estos desafíos se puede destacar que hay que lograr manejar lo mejor posible el aprendizaje de adultos, que el instructor o entrenador debe ser un facilitador para que las personas aprendan, y otro factor importante es el entrenamiento del entrenador. Con respecto al aprendizaje de los adultos valen algunas consideraciones. Los adultos de por sí tienen algunas limitaciones que dificultan su aprendizaje como por ejemplo poseer estructuras propias a veces rígidas que hace que no puedan incorporar fácilmente nuevos conocimientos. El adulto no siente la necesidad del cambio en forma natural como el niño, posee una cierta dosis de autosuficiencia, y no posee suficiente autocrítica sobre lo que debe mejorar. Todo esto dificulta su capacidad de adaptación y sus posibilidades de capacitación.

Se pueden distinguir varios pasos en lo que se denomina el aprendizaje del adulto, que hay que tener en cuenta cuando se entrena personal:

Paso1. Definición del target: establecer una idea directriz del entrenamiento estableciendo a quien va dirigido y cuál es el nivel de conocimientos previos.

Paso 2. Expectativa: Para qué la persona debe recibir esta capacitación.

Paso 3: Tiene que ver cómo desarrolla ese conocimiento, si lo hace en forma analítica o sintética.

Paso 4: Corresponde a la etapa de comprensión, cómo lograr que la persona realmente comprenda, y para eso puede hacerse de forma deductiva, es decir dando elementos para que el concepto final sea deducido, o en forma inductiva directamente. Dentro de esta etapa se incluye el entrenamiento en la resolución de problemas y para ello se pueden usar herramientas como el *role-playing*, discusiones, presentaciones orales, simulacros o simuladores computarizados.

Paso 5: Es la aplicación *in situ* de lo transmitido, donde la persona pone en práctica lo aprendido

Paso 6: Evaluación por parte del superior inmediato del nivel de comprensión de lo aprendido.

Por lo expuesto, el aprendizaje del adulto se puede resumir en:

- establecer un objetivo del entrenamiento,
- definir su contenido que debe forma parte del conocimiento del colaborador,
- la comprensión del tema que debe incluir la resolución de problemas por si mismo
- y la aplicación *in situ*.

Estructura del Programa de Entrenamiento

Es fundamental que todo programa de capacitación y entrenamiento esté claramente delineado en un Procedimiento Estándar de Operación que regule la estructura y puesta en práctica del programa. Este Procedimiento constará de secciones como Objetivo, Alcance, Ámbito de aplicación, Definiciones si son necesarias, Descripción el procedimiento en sí y las Responsabilidades.

Se deben definir los tipos de programas que se quiere tener para capacitar al personal.

Pueden existir varios en simultáneo, por ejemplo

- ✓ En función de las áreas de conocimiento: pueden existir programas de entrenamiento en GMP, Higiene y Seguridad o Microbiología.
- ✓ En función del tipo de conocimiento: según se desee capacitar en operaciones diarias, Procedimientos Estándar o en temas generales.

- ✓ En función del nivel de conocimiento ya sea básico, medio o especializado.
- ✓ En función del alcance o sea si va dirigido en forma individual, a un sector en particular o centralizados a toda la Planta.

Independientemente del tipo de programa, la estructura del mismo deberá incluir los siguientes ítems

Requisitos en función de los perfiles de puesto
Temas, contenidos y niveles de capacitación
Plan anual de entrenamiento
Material a ser usado en la capacitación
Registros de capacitación firmados
Evaluación escrita en lo posible
Gestión de los ausentes
Capacitación continua.

Como parte de la determinación de las necesidades de capacitación y como se ha mencionado anteriormente se deberá tener definido los distintos perfiles de puesto, sus tareas y un análisis de riesgo en función de la educación y experiencia. Además se debe identificar al personal nuevo, temporario, con poca experiencia, con función de conducción y necesidades de recapacitación específica como en el caso de desvíos, errores, o no conformidades.

Para el caso particular de los temas, contenidos y niveles se debe tener en cuenta por ejemplo de agrupar las necesidades en temas específicos, a cada tema asignar los contenidos correspondientes y finalmente asignar distintos niveles a los temas en función de los perfiles de puesto y nivel de capacitación del personal.

El plan anual debe indicar un cronograma de los temas a dictarse durante el año.

Para llevar a cabo dicho plan / cronograma existen una serie de tareas asociadas que implican una coordinación general de las mismas pudiendo estar a cargo de un responsable específico o de un sector, dependiendo de la complejidad.

Entre estas tareas se detallan las siguientes: fijar fechas y horarios, distribuir al personal, notificación de la capacitación, supervisión de la documentación necesaria ya sea de los registros de capacitación, el material a emplearse, la sala de capacitación y elementos necesarios a ser utilizados por el entrenador.

En la actualidad cada vez se disponen más de sistemas informáticos que permiten administrar el seguimiento de las capacitaciones en forma electrónica.

El material para la capacitación puede ser de lo más variado desde los mismos procedimientos, presentaciones, práctica *in situ*, videos educacionales entre los más tradicionales.

Hoy en día, con el avance de las nuevas tecnologías se ha ampliado mucho el uso de nuevas herramientas que permiten las capacitaciones a distancia como *virtual classrooms*, el uso de *skype* y distintas plataformas de Internet, *Web* y *e-learning,* muy útiles cuando la capacitación debe realizarse desde el exterior o entre distintas sedes de una misma compañía.

Un hecho de mucha relevancia es que las capacitaciones deben quedar registradas como comprobante de haberse llevado a cabo y que la persona que recibió el entrenamiento lo realizó y esto es lo que se denomina el registro de entrenamiento. En estos registros debe contar el nombre de la persona, a qué sector pertenece, nombre del entrenador, el tema, la fecha de la capacitación, firma de ambos, la duración y deben ser archivados junto con toda la documentación GMP relevante por plazos de tiempo claramente establecidos.

Es claro que debe evaluarse si los conceptos impartidos han sido comprendidos de la forma esperada y es por eso que debe existir algún tipo de evaluación del entrenamiento que puede realizarse de distintas formas como las más tradicionales en forma oral o escrita, obtener *feedback* mediante preguntas generales y grupales o un examen *multiple choice* o con un examen más formal según las exigencias del puesto y del tema.

Un punto que muchas veces se pasa por alto es la gestión del personal ausente, sobre todo cuando se realizan capacitaciones centralizadas. Conviene que esté a cargo del responsable del sector que en definitiva debe supervisar que todo su personal esté capacitado y puede ser entrenado por él mismo o también pueden replanificarse capacitaciones para los ausentes de los distintos sectores.

Por último, hay que mencionar la capacitación continua que permite la actualización constante, sobre todo en cargos de responsabilidad conductiva a través de cursos externos a la compañía, participación de distintas actividades profesionales a través de diferentes asociaciones, el gran recurso actual de Internet y el *e-learning* o también los trabajos de investigación que puedan realizarse cuando los tiempos de la industria así lo permitan.

Implementación del Programa

Muchas veces en las auditorías o autoinspecciones se puede detectar que los programas existen pero no están implementados correctamente y no se hace el seguimiento adecuado del mismo.

En primer lugar se debe adaptar el plan a la organización. Esto depende del tamaño de la organización, del tamaño y tipo de sector al cual se trata de aplicarlo, de los tipos de productos que se manufacturan y fundamentalmente de los objetivos a cumplir o sea que es lo que se quiere lograr con la capacitación por ejemplo mejorar la eficiencia, los problemas, disminuir desvíos, implementar nuevos procedimientos.

En segundo lugar se debe contar con los recursos necesarios. Entre estos hay que mencionar que exista un sector a cargo con la responsabilidad de organizar las capacitaciones correspondientes, que haya un coordinador general que pueda realizar el seguimiento adecuado, que exista un archivo y una administración del material de capacitación y de los registros de entrenamiento de todos los sectores y además poder contar con un ambiente o lugar específico como una sala de capacitación donde puedan dictarse los cursos en forma cómoda.

En tercer lugar hay que mencionar que la implementación exitosa implica tener presente la propia mejora continua del programa, es decir que se vaya actualizando con nuevos temas, nuevos métodos o herramientas de capacitación dentro de las cuales se puede mencionar la incorporación de personal clave a nuevos proyectos o también la rotación de puestos en los sectores que lo permitan, como parte del proceso de optimización del entrenamiento.

Conclusiones

No cabe duda que la base para lograr un desempeño óptimo dentro de un laboratorio o de una planta en general es cuidar el activo más importante que son los recursos humanos. Una forma de hacerlo es mediante buenos programas de capacitación y entrenamiento que permiten desarrollar al personal generando motivación y mejorando la calidad de las operaciones.

Para esto es responsabilidad del *Management* de asignar los recursos necesarios y cumplir y hacer cumplir los requerimientos que hoy exigen las normativas locales e internacionales en este aspecto.

Bibliografía

1. European Commission. *Good Manufacturing practice. Medicinal Products for Human and Veterinary use*. Chapter 2. (2011)
2. World Health Organization, Technical Report Series: WHO TRS 908 *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products*: Annex 4. (2003)
3. 21 Code of Federal Regulations CFR 211 Subpart B.
4. Pharmaceutical International Convention: PIC/s. *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products.* Part I Chapter 2 and Part II Chapter 3 (2009)
5. Disposición 2819/ 2004. *Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/ Exportadores de Medicamentos.* ANMAT (2004)
6. USP Chapter 1117. *Microbiological Best Laboratory Practices*

Capítulo VI.8.

Auditoría del Laboratorio Microbiológico

Néstor Oscar Aversa

Introducción.

Objetivo.

Auditoría.

Conclusiones.

Bibliografía.

Abreviaturas.

Otros términos.

Introducción:

Diferentes definiciones existen en la literatura sobre el concepto de auditoría. Más allá de si se trata de una auditoría interna o de primera parte (auto-inspección), auditoría externa o de segunda parte (realizada por un cliente), auditoría regulatoria / certificación o de tercera parte (realizada por autoridad sanitaria o ente certificador respectivamente), todas ellas deben cumplir varios requisitos básicos:

- Referirse a una norma o documento de referencia para realizar la auditoría y determinar el objetivo de la misma.
- Documentar los hallazgos o no-conformidades en forma sistemática e independiente de tal forma que permita evaluar objetivamente si los criterios de aceptación han sido cumplidos o no [(1)].
- Agregar valor y mejorar la performance de la organización [(2)].
- Tener en cuenta los resultados de auditorías previas y las acciones tomadas.
- Que el equipo auditor sea idóneo, competente y no esté comprometido con el sector a auditar [(1)].
- La existencia de un plan que con cierta periodicidad y en función de un análisis de riesgo previo determine la frecuencia de las auditorías.
- La existencia de un plan de acciones correctivas y preventivas como resultado de las no-conformidades halladas y su correspondiente seguimiento [(3)].

Objetivo:

Indicar las principales actividades a relevar en un laboratorio microbiológico perteneciente a la industria farmacéutica, cosmética o de dispositivos médicos, así como las diferentes variantes para el cumplimiento de los requisitos.

Si bien no se considera una no-conformidad el cumplir los requisitos mediante procedimientos operativos, este capítulo priorizará el cumplimiento a través del diseño [(4)] y del análisis de riesgo [(5)].

Auditoría:

Se deben considerar varias partes en la realización de la misma:

- Instalaciones.
- Laboratorio propiamente dicho.
- Equipos e instrumentos.
- Procedimientos.
- Registros.
- Capacitación.

Instalaciones:

Históricamente el diseño relativo a operaciones con productos generales y/o segregados estuvo enfocado a las Plantas Productivas y no a Control de Calidad.

Las necesidades de evitar contaminaciones cruzadas, mezclas, la protección de personal y del medio ambiente, así como las tendencias actuales de evaluar las operaciones en función del riesgo paciente + riesgo instalaciones + riesgo personal, ha hecho reaccionar a la Organización Mundial de la Salud en el sentido que los laboratorios de control de calidad no pueden ni deben estar exentos de ser estudiados en forma profunda para **minimizar** los problemas mencionados [6,7,8,9].

En ese sentido debe evaluarse la estructura y terminaciones del edificio, los sistemas de aire, sus flujos y renovaciones, los diferenciales de presión, condiciones de temperatura y humedad relativa (si esta se requiere), flujo de materiales, personal y residuos, procedimientos de vestimenta, el tipo de productos manipulados en el sector (generales y/o segregados). El auditado puede basarse en la definición e implementación de todas estas variables en función del análisis de riesgo a los efectos de prevenir costos elevados de capital y de operación innecesarios.

En particular y referido a los sistemas de aire deberá tenerse en cuenta en la evaluación lo siguiente:

- Independencia del sistema de aire respecto a cualquier otro de la planta (Laboratorio químico, Producción).
- Renovaciones de aire: Seleccionado por las necesidades más que por la "tradición". Se recomienda entre 6 a 20 renovaciones/hora según la Organización Mundial de la Salud, pero se insiste en que los rangos de tolerancia sean fijados en la calificación de las instalaciones.
- Sistema abierto vs. Sistema auto-contenido (Ej. aislador) para ensayos de esterilidad.
- Partículas generadas por el proceso y los operadores.
- Carga térmica, a los efectos de disponer de temperatura de confort y prevenir contaminación microbiana. Por otra parte es necesario recordar que las estufas presentes habitualmente en los laboratorios solo aumentan la temperatura y no la bajan. Así por ej. una estufa con rango de operación 30-35ºC debe estar ubicada en un recinto cuya temperatura no supere los 25ºC las 24 horas del día.
- Renovación 100% del aire o con retorno. En este último caso deberá probarse que no se genera contaminación cruzada. Dado que el laboratorio pertenece al nivel 3 (condición controlada) en caso de usar aire recirculado debe verificarse la existencia de filtros G4 + F8 + H13. Si se emplea 100% de aire fresco sin recirculación el sistema puede contener filtros G4 + F8 u F9. (10) Esta apreciación es válida para las áreas generales, no las de siembra microbiológica o test de esterilidad. En el sector donde se ubican los autoclaves (de esterilización y decontaminación) también es recomendable aire 100% sin renovación para no extender los malos olores generados a otros sectores.
- Suficiente presión para mantener los diferenciales requeridos que no deben tener la posibilidad que los valores se superpongan en algún momento en cuyo caso se anularían dichos diferenciales.
- Internamente los cuartos más limpios del punto de vista de partículas y contaminación microbiana deben disponer de diferenciales de presión positivos con respecto a áreas menos limpias. Figura 1.
- Para el caso de productos segregados debe existir un sector independiente con sistema de aire también independiente que cumpla las siguientes características o bien una cabina de bioseguridad del tipo IIA.
  - ✓ Debe hallarse con presión negativa respecto a la presión atmosférica.

- ✓ Evaluar la presión diferencial y flujo de aire (en este caso es conveniente alta presión diferencial y bajo flujo de aire). La OMS considera un Δp=15Pa con un rango que puede oscilar entre 5 Pa y 20 Pa.

Figura 1. *Sello tipo cascada.*

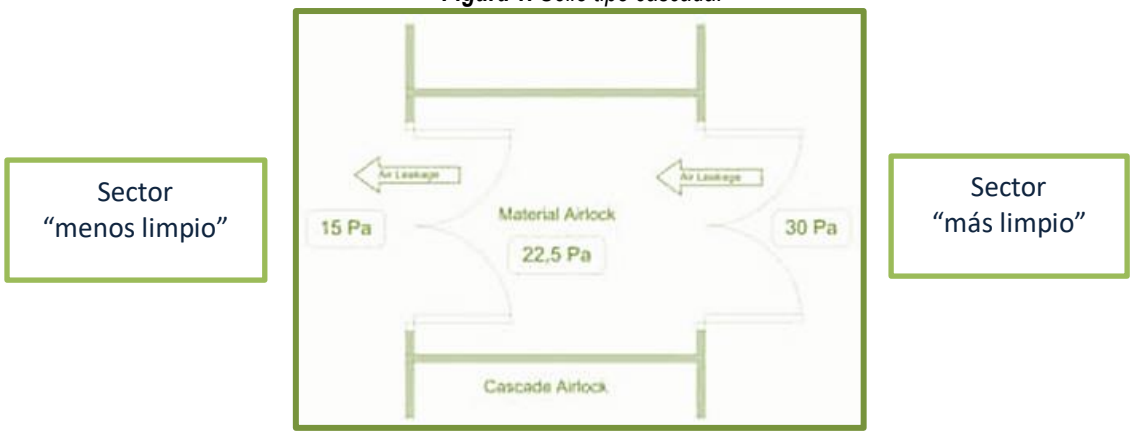


Figura 2. *Sello tipo sumidero (Sink Airlock).*

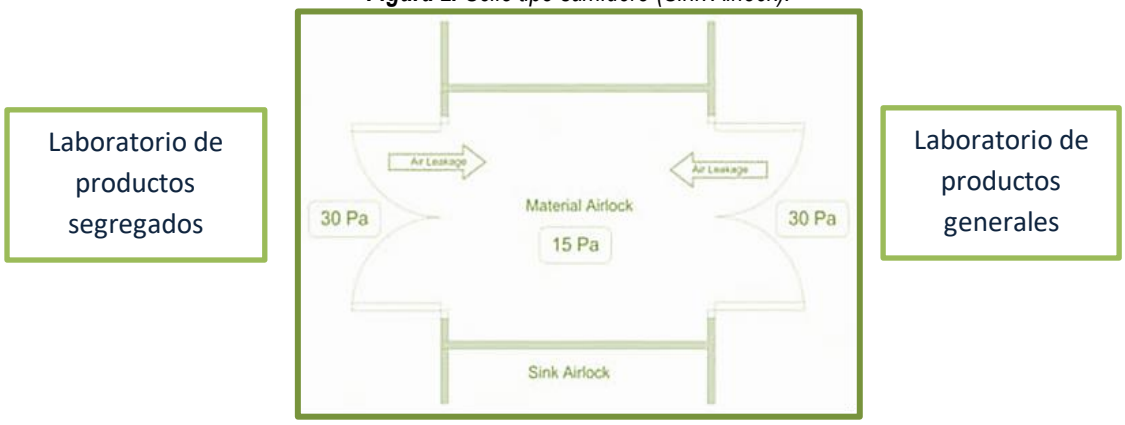
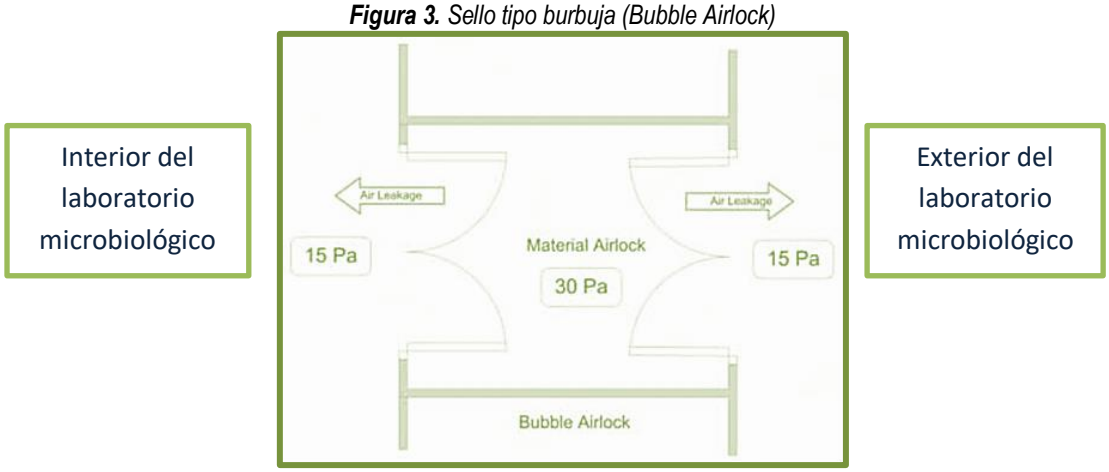


Figura 3. *Sello tipo burbuja (Bubble Airlock)*



Nota: Se aclara que los valores indicados de presiones en estas 3 figuras son sólo ejemplos y no se deben integrar los contenidos de las mismas. Los valores reales deben surgir de la concepción del laboratorio microbiológico como una unidad. Si bien los ejemplos están dados para sello de materiales los mismos conceptos son válidos para sellos de personal.

Contrariamente a lo que sucede en áreas estériles con productos biológicos o segregados, para el laboratorio microbiológico se mantiene el concepto que las áreas críticas tengan presión positiva con respecto a las otras,

manteniendo el concepto de cascada pero, con la presencia (entre el sector segregado y el de generales si no se trata de dos laboratorios totalmente independientes) de sellos de personal y materiales tipo sumidero con extracción del aire que provenga del sector segregado y del sector general. Ver Figura 2.

- Para los sellos que limitan al sector microbiológico con el pasillo general externo al laboratorio se recomienda sello tipo burbuja, que evitará la diseminación de contaminantes microbiológicos por fuera de dicho laboratorio. El aire inyectado en el sello tipo burbuja debe ser al menos de la misma calidad que el aire del sector microbiológico. Este tipo de sello también es recomendado para los vestuarios, los que en condición *at rest* deben ser de la misma clasificación de área que el área a la que conducen. Ver Figura 3.
- El auditor debe evaluar el flujo de materiales, personal y residuos. El personal y materiales no deberían movilizarse de una zona más limpia a otra menos limpia y volver a la zona más limpia a menos que se sigan procesos de cambio de vestimenta y/o descontaminación. Del punto de vista del diseño más que de lo operativo esto puede lograrse mediante movimientos unidireccionales y anillos de contención por fuera de las instalaciones del laboratorio.

Laboratorio propiamente dicho:

El auditor debe verificar que tanto el laboratorio como ciertos equipos de soporte (autoclaves, hornos, material de vidrio) sean dedicados y separados de otras áreas. Debe poseer suficiente espacio para evitar *mix ups*, contaminación microbiana y contaminación cruzada.

Dentro del laboratorio microbiológico debe verificar que haya espacios separados para que las actividades como preparación de muestras, medios de cultivo y de equipos, recuento de microorganismos, trabajos con microorganismos vivos estén segregadas por espacio (diseño) o al menos en el tiempo para minimizar riesgos de contaminación, falsos positivos y falsos negativos. (Operación y análisis de riesgo). Para el caso de áreas de control de esterilidad no pueden ser compartidas para otras tareas.

Los materiales de construcción deben ser tales que faciliten la limpieza, desinfección y minimicen los riesgos de contaminación.

El sistema HVAC como se ha mencionado previamente debe ser independiente y no debe constituir fuente de contaminación, debiéndose explicitarse los niveles de contención y el laboratorio debe tener acceso restringido.

Para efectuar el test de esterilidad sí debe existir un área segregada de similares características y requisitos que el área limpia productiva, a saber:

- Ensayo: Grado A, UDAF o cabina con flujo laminar en entorno grado B.
- Aislador Grado A, en entorno no clasificado.
- Tanto clase A como B: Filtros HEPA terminales para test de esterilidad.
- Alarmas e indicadores de presiones diferenciales. Registro a menos que exista un sistema de monitoreo continuo. Si el registro es manual debe tomarse al ingreso y a la salida al habitáculo.
- Superficies suaves que eviten acumulación de partículas.
- No puede haber drenajes.
- Instalaciones de lavado por fuera de los vestuarios.
- Grado D-------Grado C--------Grado B (entorno del grado A)----------Grado A debe ser secuencial.
- Interlockeado de puertas con verificación que no pueda abrirse una puerta hasta que, habiéndose cerrado la otra, se produzca 100% de renovación de aire en el sello.
- Presión positiva. Ver más arriba en *Instalaciones.*
- Sistema y procedimientos de descontaminación.

Debe verificarse la clasificación de áreas en base a la criticidad del producto y a la operación que se lleva a cabo.

Un aislador para test de esterilidad debe estar equipado con filtros HEPA como mínimo y las condiciones son las siguientes:

- *At rest*: ISO clase 5.
- Trabajando: No hay requisitos para velocidad de aire ni cambios porque es una operación que puede generar partículas.
- Debe estar sellado como para que los agentes esporicidas o gases en el medio ambiente estén a valores bajos.
- Cuando disponga de aberturas directas con el exterior debe mantener presión positiva hacia dicho exterior. 20 Pa o más de sobrepresión son valores típicos, pero no debe excederse de las recomendaciones del fabricante. Tener en cuenta que el aislador no dispone de salida al exterior.
- El flujo puede ser unidireccional o turbulento.
- Debe haber temperatura y humedad de confort en el interior del aislador, dependiendo esta condición del sistema de desinfección empleado (tanto el peróxido de hidrógeno o con mezclas estabilizadas de peracético tienen requisitos de humedad y para el peróxido de hidrógeno es crítica la temperatura). Deben evitarse puntos fríos que podrían generar mayor condensación.

Para el caso de laboratorios de microbiología que debe analizar productos segregados debe verificarse lo siguiente:

- Instalaciones para *Test* de esterilidad separadas de aquellas para análisis de productos no-estériles.
- Salvo el sistema de aire independiente y el sistema de agua, no se pide que los demás servicios lo sean.
- Flujo laminar de seguridad biológica o aislador o ambos.
- Sellos acorde a lo indicado en *Instalaciones.*
- Todo material no descartable remanente no podría usarse en el laboratorio general sin previa inactivación y descontaminación debidamente validada en el lugar segregado.
- Pasaje de materiales esterilizables a través de autoclave de doble puerta.
- Pasaje de materiales no esterilizables por autoclave a través de *pass-box* previa desinfección química y/o por luz ultravioleta.
- El material descartable podría ser debidamente envuelto y retirado a través del *pass-box* para incinerar.
- El remanente de medios de cultivo no puede usarse en el laboratorio general.

Para cualquiera de las instalaciones el auditor debe verificar lo siguiente

- Procedimientos de ingreso, salida y vestimenta.
- El uso de cada área.
- Las restricciones impuestas a cada área de trabajo y sus motivos.
- Los equipos no deben moverse entre áreas de distinta clasificación para evitar contaminación accidental.
- Los equipos no deben usarse en otras áreas a menos que se tomen medidas para evitar contaminación cruzada.

El auditor debe además verificar que la clasificación de las áreas sea acorde a la criticidad de las tareas que allí se realizan. Una guía resumen para ello se indica en la Tabla 1.

Tabla 1.

AREA	GRADO	PROPUESTO
Recepción de muestras	Sin clasificar	Sin clasificar
Preparación de medios	Sin clasificar	Sin clasificar
Carga de autoclave	Sin clasificar	Sin clasificar
Descarga del autoclave, dentro del área para test de esterilidad	Grado B	ISO 5 (turbulento) y <10 ufc/m³
Test de esterilidad Flujo laminar unidireccional (UDAF)	Grado A	ISO 5 (UDAF) y <1ufc/m³
Test de esterilidad-alrededor del UDAF	Grado B	ISO 5 (turbulento) y <10 ufc/m³
Test de esterilidad-aislador	Grado A (Partículas no viables y microbiología solamente)	ISO 5 (UDAF) y <1 ufc/m3
Test de esterilidad- alrededor del aislador	Sin clasificar	Sin clasificar
Incubadora	Sin clasificar	Sin clasificar
Recuento (UDAF en operaciones críticas)	Sin clasificar	Sin clasificar
Descontaminación	Sin clasificar	Sin clasificar

Equipos e instrumentos:

El auditor debe verificar, como parte del programa de Aseguramiento de Calidad de la empresa, que el laboratorio de microbiología dispone de un plan documentado de calificación de equipos, calibración de instrumentos y un sistema de control de cambios acorde a los mismos (Alta, baja, modificación). Además debe verificarse la identificación y rotulación unívoca de cada equipo o parte de él así como de los instrumentos que lo componen.

En la norma regulatoria argentina [11] se solicita la calificación de diseño, de instalación, operación y performance de equipos e instalaciones nuevas.

Para la calificación de diseño (complementado a veces con el FAT) es necesario que el auditado disponga de todos los antecedentes, requisitos de usuario, presupuestos y justificación de la selección del proveedor.

Para la calificación de instalación es necesario verificar la existencia de Descripción del equipo, Planos y Manuales, Procedimientos, Resultados que avalen haber realizado dicha calificación y calibración de instrumentos, que se ha puesto vigente un plan de Mantenimiento Preventivo y que se ha entrenado al personal, así como también se ha confeccionado un listado de repuestos.

Para verificar la realización de la calificación de operación debe existir documentación probatoria que el equipo funciona en los rangos anticipados de operación, que se determinaron los parámetros operativos, los puntos de seteo, que se verificaron los ensayos funcionales de los componentes y el control de secuencias y alarmas, presiones, temperatura, velocidades de flujo cuando corresponda. También es importante verificar el programa de ensayos, plan de muestreo, frecuencia, límites de aceptación.

Las **balanzas** constituyen un caso particular pues deben ser calificadas, calibradas, disponer de un plan de mantenimiento preventivo y de verificación periódica con pesas certificadas. Debe verificarse la existencia de cartas de control con límites de alerta y acción establecidos estadísticamente.

Es recomendable que las balanzas tengan registro de pesada. En el caso de áreas limpias se recomienda balanzas conectadas por wifi o bluetooth para que la impresión se realice fuera de dicha área.

Para el caso de **pHmetros** el auditor deberá verificar el control diario con 2 buffers, la limpieza de electrodos, el remplazo de la solución saturada de cloruro de potasio y la verificación del instrumento frente a puente de Wheastone.

Purificadores de agua: Normalmente el laboratorio utiliza agua purificada del sistema de producción. Si no es posible el laboratorio debe tener un purificador de agua. En este caso la verificación consistirá en que exista control microbiológico y químico sobre la calidad del agua obtenida, que la señal del conductímetro haya sido contrastada frente a resistencia patrón, que se realice sanitización periódica si corresponde, y que todas las actividades se hallen documentadas.

Las **estufas de incubación**, **heladeras** y **freezers** deben tener realizados los perfiles térmicos periódicamente, los termómetros y registradores o *data-loggers* deben estar calibrados, que se documente la limpieza, descongelación y todo otro mantenimiento. Además es recomendable el control del tiempo en que puede dejarse abierta la puerta mientras se realiza la tarea de carga y descarga, sin que la temperatura esté fuera de rango

Para los **autoclaves** es particularmente importante que el auditor verifique de las distintas etapas de calificación lo siguiente: FAT y SAT si fueron realizados, comparación del equipo vs. planos, calibración de sensores, manómetros, termómetros, procedimientos, documentación del proveedor, desvíos observados, interlockeado de puertas si corresponde, chequeo de programas, alarmas, validación de sistemas informáticos si los hubiera, calidad del vapor, integridad de cámara, integridad de filtros de venteo, verificación de la distribución de cámara vacía y con cada patrón de carga, determinación de punto frío y caliente, cantidad de sensores empleados en la calificación con su calibración pre y post calificación, reducción de carga microbiana con indicadores biológicos, diseño de los ciclos de esterilización (overkill o SAL= 10^{-6}), mapeo de las cargas, criterios de aceptación.

Para los **hornos despirogenantes** el auditor tiene que verificar como puntos fundamentales, también a lo largo de las distintas etapas de calificación lo siguiente: determinación del punto frío, homogeneidad de temperatura, el sistema de toma y extracción de aire, integridad de filtros HEPA, conteo de partículas (Clase A), sistema de calefacción, puntos de seteo, análisis de vibraciones, rotación del calefactor, interlockeado de puertas, integridad de sellos, alarmas, revestimientos, calibración de registradores y sensores, cantidad de sensores empleados en la calificación, balance de aire en cámara vacía, que la presión positiva sea ejercida hacia el lado “sucio” cuando la puerta esté abierta, estudios de distribución y penetración, ensayo con endotoxinas bacterianas que demuestren al menos una reducción de 10^3 la cantidad inicial en el punto frío.

Todos los equipos involucrados en la esterilización deben tener un plan de recalificación periódica, disponer de documentos que avalen las tareas realizadas, que los ciclos representen los rangos operacionales habituales de uso y que los procesos sean monitoreados como parte de la operación rutinaria.

En la calificación de **flujos laminares** el auditor debe verificar que el aire circule de la zona más crítica a la menos crítica (menos limpia), que se mantengan los diferenciales de presión, integridad de filtros, mantenimiento y recambios periódicos de prefiltros y filtros, velocidades y el cumplimiento de sus especificaciones, penetración de partículas, test de fugas, patrones de velocidad, calibración de termómetros y manómetros. Además el laboratorio debe contar con un plan de monitoreo ambiental dentro y fuera de las cabinas con límites estadísticos de alerta y acción.

En la calificación de **aisladores** el auditor deberá fundamentalmente observar todas las pruebas realizadas para mantener el ambiente dentro del aislador controlado como ISO clase 5, los procedimientos de limpieza y esterilización del aislador, así como la validación de la eliminación del agente esporicida y la integridad de guantes, y un plan vigente de controles ambientales realizados en operación con límites de alerta y acción establecidos estadísticamente.

Una guía sugerida para el auditor a los efectos de controlar los planes de mantenimiento de equipos se indica en la Tabla 2.

***Tabla 2**. Mantenimiento de equipos / Instalaciones*

TIPO DE EQUIPO	REQUERIMIENTO	FRECUENCIA SUGERIDA
-Incubadoras -Heladeras -Freezers	Limpiar y desinfectar superficies internas	-Mensualmente -Cuando se requiera (3 meses) -Cuando se requiera (anual)
Baños de agua	Vaciar, limpiar, desinfectar y rellenar	Semanalmente
Centrífuga	-Servicio -Limpiar y desinfectar	-Anualmente -Cada uso
Autoclaves	-Hacer chequeos visuales de juntas, cámara y drenajes -Servicio completo -Presión hidráulica	-Regularmente, según el fabricante -Anualmente según el fabricante -Anualmente
Cabinas de seguridad unidireccional	Service completo y chequeos mecánicos	Anualmente, según el fabricante
Microscopios	Service mantenimiento completo	Anualmente
pHmetros	Limpieza electrodo	Cada uso
Balanzas	-Limpieza -Servicio -Verificación	-Cada uso -Anualmente -Diario con pesa de verificación
Destiladores	Limpiar y desincrustar	Según se requiera (3 meses)
Desionizadores, Ósmosis inversa	Remplazar cartuchos/membranas	Según recomendación del fabricante
Jarras anaeróbicas	Limpiar / Desinfectar	Después de cada uso
Dispensadores de medios, equipamiento volumétrico, pipetas	Descontaminar, limpiar y esterilizar	Cada uso. Se recomienda material descartable

NOTA: La información contenida en la Tabla 2 debe tomarse sólo como un ejemplo y la frecuencia final estará basada en la necesidad, tipo y performance previa de los equipos, sobre las recomendaciones del fabricante y el análisis de riesgo correspondiente, al menos para los equipos e instrumentos críticos.

Procedimientos:

- *Muestreos*: El auditor debe verificar la existencia de los elementos de muestreo perfectamente rotulados con su fecha de vigencia, registros de esterilización y debería concurrir a presenciar muestreos donde el material/producto esté expuesto para verificar el cumplimiento de las técnicas asépticas de muestreo. Los recipientes muestreados deben ser identificados. Se debe retirar muestra suficiente como para realizar 3 ensayos completos.
- *Recepción de Muestras*: Debe verificarse la integridad de las muestras recibidas, su rotulación y procesamiento dentro de los tiempos recomendados. También deben almacenarse en condiciones controladas de temperatura, humedad e inviolabilidad hasta que sean analizadas. Debe existir una bitácora dedicada a la recepción de muestras donde se indique fecha de recepción, producto/material, código del mismo, etapa (en caso de productos), lote, cantidad recibida y además se verifique su correspondencia con el rótulo de las mismas. En el caso de muestras que deben ser analizadas dentro de un determinado tiempo, como las muestras de aguas, verificar el cumplimiento de no más de 8 horas de retirada la muestra si fue debidamente conservada (refrigerada entre 2-8 ºC)

- *Análisis de muestras*: Deben existir procedimientos específicos para cada tipo de análisis microbiológico: para materiales no estériles, aguas, productos estériles, controles ambientales, endotoxinas bacterianas, potencia de antibióticos, eficiencia de desinfectantes, etc. En cada uno de ellos deben figurar los números de lotes de medios de cultivo empleados, referencia al procedimiento de preparación, cantidad de muestra a emplear, condiciones de incubación, tiempos de lectura y forma de informar los resultados, así como los criterios de aceptación. Debe existir una bitácora para el reporte de los datos crudos obtenidos en el laboratorio donde la información mínima indicada en párrafos precedentes.
- *Resultados*: Se deberá indicar como se reportan, si se emite un certificado de análisis microbiológico o los resultados se vuelcan en un único certificado junto con el análisis físico-químico. Sea cual sea el mecanismo elegido debe haber una referencia clara a los datos crudos (número de cuaderno, página). Los resultados deben hallarse verificados por al menos un Supervisor o el Jefe del sector.
- *La trazabilidad* de las operaciones y su verificación constituye una tarea fundamental en la auditoría para evitar errores e interpretaciones incorrectas de resultados.
- *Procedimientos de vestimenta*: Particular atención debe prestarse (en el caso de equipos reusables) sus procedimientos de limpieza y esterilización. Tipo de vestimenta para los diferentes trabajos del sector. Cómo se evita la contaminación de la ropa empleada en áreas limpias versus la empleada en áreas comunes del laboratorio, particularmente la empleada para tareas de cepario y tipificación, sobre todo cuando se trabaja con hongos filamentosos.
- *Ingreso a las áreas*: En conjunto con el punto anterior debe verificarse la existencia y cumplimiento del procedimiento de ingreso y egreso a cada área del laboratorio. Es recomendable colocar un cartel gráfico en los vestuarios donde se indique el procedimiento de vestimenta. Particular atención debe prestar al auditor para que por ejemplo personal encargado de muestreos no ingrese o trabaje en el área con microrganismos vivos a menos que se tomen precauciones especiales como cambio de ropa, uso de guantes y sanitizado de manos antes de salir del sector.
- *Limpieza de materiales*: Es particularmente crítica para limpieza manual. Debe verificarse la ausencia de restos de detergente, desinfectantes u otro material que pudiera inhibir el crecimiento de los microrganismos para lo que este procedimiento de limpieza debe hallarse validado del punto de vista de residuos químicos. Verificar la capacitación del personal que lava el material. También del personal eventual que realiza esa tarea durante vacaciones o licencias.
- *Medios de cultivo*: Se deberá evaluar lo siguiente:
    - Medios deshidratados: Almacenamiento, fecha de recepción, fecha de apertura de frascos y el registro y stock de los mismos.
    - Preparación de medios: Instrucciones, registro de cantidad de medio preparado, pesada del medio y su registro, pH antes y después de la esterilización a temperatura ambiente o con electrodos de compensación de temperatura para lo que puede requerirse un electrodo de superficie para medios sólidos, lote del medio deshidratado, lote del medio preparado, cantidad de agua empleada, volumen de fraccionamiento, condiciones de almacenamiento y su vencimiento en base a estudios de validación o recomendación del fabricante.
    - Esterilización: Debe verificarse que las condiciones son las indicadas por el fabricante o las determinadas por la validación realizada por el usuario. Las condiciones habituales que indican los fabricantes para esterilización por calor húmedo son 121°C durante15 minutos dentro del recipiente (*overkill*) por lo que el auditor debe verificar en los estudios de penetración a carga máxima que dicha condición se cumple. Debe verificarse también en esos estudios que la etapa de calentamiento sea rápida para evitar que una pendiente ligera de incremento de temperatura conduzca finalmente a sobrecalentamiento del medio de cultivo y por ende a su posible degradación e inutilización.
    - Test de promoción de crecimiento: Instrucciones para medios cuantitativos y medios selectivos, criterios de aceptación, frecuencia, registros, cepas utilizadas según farmacopea. Como parte de los ensayos a realizar deben incluirse las cepas indicadas en monografía y sin que constituya un requisito es deseable el uso de aislamientos de planta [12,13,14,15,16,17]. Además verificar si los medios tienen o no poder inhibitorio, propiedades indicativas y chequeos periódicos de estabilidad para justificar su periodo de

expiración[18,19]. Debido a que desde que se abre un envase de un medio deshidratado hasta que se consume totalmente, y aunque sean almacenados correctamente, están expuestos a un rápido deterioro particularmente por fenómenos de hidratación es que es altamente recomendable para el auditor verificar que el GPT se realiza sobre cada lote de medio preparado y esterilizado.

- *Reactivos*: Debe verificarse (por ej. en los colorantes empleados para tinción de Gram, test de oxidasa) que se han probado frente a organismos indicadores antes de ser empleados.
- *Cepario*: Listado de cepas de referencia, cantidad de repiques (máximo 5 desde el cultivo original tal cual indican las farmacopeas, un subcultivo en el que haya desarrollo microbiano es considerado un pasaje), frecuencia, condiciones de almacenamiento, registro, cepas aisladas de planta y su caracterización, rotulación y vencimiento de las cepas. Debe chequearse su pureza antes de ser usados en control de calidad. La verificación de la cantidad de pasajes es fundamental para garantizar el mantenimiento de las características de crecimiento, variación fenotípica, cambios genéticos, así como contaminación cruzada.
- *Sistemas de identificación microbiana*. Almacenamiento, controles positivos y negativos, frecuencia. Uso de cepas patrón.
- *Controles microbianos*: Validación de métodos, condiciones de incubación, tiempos. Se debe verificar que la recuperación no sea inferior al 50% ni superior al 200% con respecto a un medio patrón. El medio patrón puede ser seleccionado por primera vez como aquél medio de cultivo preparado con agua tridestilada. Sucesivamente se debe ir controlando la calidad del nuevo medio de cultivo frente al remanente del lote anterior.
- *Controles de esterilidad*: Validación de métodos de acuerdo a las cepas farmacopeicas, condiciones de incubación, tiempos, porosidad de filtros empleados. Se deben realizar 3 corridas de validación consecutivas satisfactorias. El inóculo debe ser menor a 100 unidades formadoras de colonia / por el volumen del medio.
- *Control microbiológico de aguas*: Frecuencia, distribución de puntos de muestreo para agua potable, purificada y para inyectables, métodos empleados (siembra en placa, filtración por membrana). Establecimiento de niveles de alerta y acción [20]. Auditar el procedimiento de establecimiento de dichos niveles los que deben ser actualizados anualmente.
- *Controles ambientales*: Frecuencia, distribución de puntos de muestreo, establecimiento de límites de alerta y acción tanto para localizaciones dentro del laboratorio como para Planta. Debe verificarse cuál es el método elegido para los controles ambientales: muestreadores, placas Rodac, hisopos, placas de sedimentación [17]. En todos los casos definirse claramente las condiciones de incubación, medidas a tomar para evitar la desecación de los medios durante la incubación.
- *Ensayo de endotoxinas bacterianas*: método utilizado, condiciones de almacenamiento de reactivo y endotoxina, controles positivos y negativos, validación de métodos para productos, establecimiento de límites. Curvas de calibración [21].
- *Test de eficacia de conservadores*. La verificación de estos ensayos es fundamental para evaluar la performance microbiológica durante el uso de productos multidosis. Dado que con el tiempo han ido variando los criterios de aceptación, es altamente recomendable la verificación *in situ* de los requisitos farmacopeicos: inóculo, tiempos y temperaturas de incubación, criterios de aceptación.
- *Programas para valoración de antibióticos*: Si se realizan ensayos de determinación de potencia de antibióticos deberá verificarse el desafío de los programas estadísticos para la determinación.
- *Procedimientos de limpieza y desinfección:* El auditor deberá verificar la validación del uso de desinfectantes, su concentración, periodo de vencimiento, esterilización, política de rotación de desinfectantes.
- *Validación microbiológica de la limpieza*: Revisar protocolos de validación, resultados, cantidad de corridas, materiales empleados, criterios de aceptación, periodo en el cual los utensilios o equipos pueden estar sucios sin lavar y periodo máximo considerado para un equipo como que permanece en estado de “limpio”.
- *Descontaminación*. Verificar si se cuenta con un equipo dedicado a descontaminar material (diseño) o bien se utiliza el mismo equipo (operación). En caso de disponerse de un único equipo justificación a través de procedimientos que no se cometen riesgos de contaminación en zonas limpias del laboratorio.

- *Procedimientos de resultados OOS y OOT* [22]. Puede estar integrado o no al procedimiento del laboratorio químico como un único procedimiento. Lo fundamental es que se verifique por parte del auditor que se hayan realizado todas las investigaciones, análisis y su revisión a los efectos de determinar si se trató o no de un error de laboratorio. Debe verificarse también en qué casos se admitirá retest y en qué casos remuestreo. En cualquiera de los dos casos el laboratorio debe investigar la causa-raíz del problema o incumplimiento encontrado. En caso no confirmación del OOS (*Out-of-Specification*) y/o OOT (*Out-of-Trend*) deberá encararse un plan de acciones correctivas y preventivas por parte del laboratorio y verificarse su eficacia.

Registros:

El auditor deberá verificar la existencia de registros de todas las operaciones descriptas en los procedimientos que indiquen el cumplimiento de los mismos. Particularmente deberá hacer hincapié en todo lo referido a integridad de las instalaciones (temperatura, diferenciales de presión, humedad si corresponde), flujo de personal, materiales residuos y todas las tareas habituales del sector que fueron descriptas en el punto anterior.

Debe verificarse la existencia de bitácoras de uso de los equipos donde se haga constar todas las actividades que se realizan sobre el mismo: uso propiamente dicho con el detalle de los materiales involucrados y registros si correspondiese, calificaciones, recalificaciones, reparaciones, calibraciones, mantenimiento preventivo, cambio de partes y toda otra actividad que se considere relevante para el buen funcionamiento de los mismos.

Capacitación:

El auditor deberá verificar la existencia y vigencia de planes de capacitación para todos los empleados del sector. En el caso particular de un laboratorio Microbiológico toda capacitación debe reflejarse finalmente en la comparación de los ensayos realizados por el analista a entrenar versus los obtenidos simultáneamente por un analista ya entrenado. Puede ser de mucha utilidad la existencia de filmaciones relativas a procedimientos de vestimenta, acceso y egreso a áreas limpias, uso de flujo laminares y aisladores y técnicas asépticas. Todas estas actividades también deben estar registradas y debe existir un plan periódico de reevaluación del personal en base a los resultados obtenidos de su tarea rutinaria, controles positivos y negativos, resultados fuera de especificación y/o fuera de tendencia, falsos positivos y falsos negativos.

Conclusiones:

El propósito fundamental de cualquier auditoría es comparar la performance real del laboratorio en contraste con lo indicado en una norma o normas de referencia.

Constituye un punto fundamental en el éxito de la misma la calificación del auditor o equipo de auditores para que la evaluación del sector auditado sea realizada en base a hechos y no a presunciones, en forma objetiva y completada en tiempo y forma.

Desde este punto de vista es fundamental también que el sector auditado pueda demostrar el cumplimiento de la o las norma/s mediante el cumplimiento de los procedimientos y sus respectivos registros. Particular interés debe despertar para el auditor que los procedimientos no infrinjan puntos de la norma o normas en cuestión. Debe verificar primero que los procedimientos del laboratorio estén preparados acorde a ellas y que los registros indiquen su cumplimiento.

En forma adicional y teniendo en cuenta que más allá de las obligaciones con otros sectores, clientes o autoridades regulatorias /certificadoras según el tipo de auditoría, el auditor puede indicar recomendaciones sobre hechos que, si bien no constituyan no-conformidades, sirvan para mejorar al sector y por ende la performance de la organización.

Bibliografía:

1. ISO 19011-2011: "*Guidelines for quality and of environmental management systems auditing*".
2. Instituto de Auditores Internos (USA). *Definición de auditoría interna*.
3. Disposición ANMAT 2819. *Autoinspección y auditorías de calidad*. Capítulo 8, punto 8.1 2004.
4. ICH Q8 (R2). *Pharmaceutical Development*. 2009.
5. ICH Q9: *Quality Risk Management*. 2005.
6. OMS. Informe Técnico *No. 957.* B*uenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos.* 2010.
7. WHO, Technical Report Series, No. 961, Annex 2: *WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories.* 2011.
8. WHO Technical Report Series, No. 961, Annex 3. WHO *Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles*. 2011.
9. WHO Technical Report Series, No. 961. Annex 5. *Supplementary guidelines on good manufacturing practices for heating, ventilation and air-conditioning systems for non-sterile pharmaceutical dosage forms*.
10. EN 779/2002 y EN 1822/2009.
11. Disposición ANMAT 2819. *Calificación y Validación*. Capítulo 4, punto 4.3 2004.
12. FDA. Gu*idance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice.* 2004.
13. USP vigente. <1072>. *Disinfectant and Antiseptics*.
14. Pharmaceutical Inspection Convention / Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme (PIC/S). *Recommendation on Sterility Testing*. 2007.
15. Parenteral Drug Association. Technical Report No. 22: *Process Simulation for Aseptically Filled Products*. 2011.
16. USP vigente. <1117> *Microbiology Best Laboratory Practices*.
17. USP vigente <1116> *Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments*.
18. USP vigente <61> *Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests*.
19. USP vigente <62> *Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Tests for Specified Microorganisms.*
20. USP vigente.<1231> *Water for Pharmaceutical Purposes*.
21. USP vigente. <85> *Bacterial Endotoxins Test*.
22. FDA. Guidance for Industry. *Investigating Out-of-Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production*. 2006.

Abreviaturas:

FAT: *Factory Acceptance* Test. Prueba de aceptación en fábrica.
Filtros HEPA: *High Efficiency Particulate Air.* Históricamente conocidos como filtros absolutos. Hoy existe una vasta clasificación de filtros cuya referencia se indica en la bibliografía.
GPT: *Growth Promotion Test. o Ensayo* de Promoción de Crecimiento.
HVAC: *Heat, Ventilation and Air Conditioning. o* Calentamiento, Ventilación y Aire Acondicionado
ISO: *International Organization for Standardization.* Organización Internacional para la Estandarización.
OOS. *Out of specifications.* Fuera de especificaciones.
OOT: *Out of trend*. Fuera de tendencia.
Pa: *Pascales.* Unidad de presión.
SAL: *Sterility Assurance Level.* Nivel de Aseguramiento de Esterilidad *(*en términos probabilísticos)
SAT: *Site Acceptance* Test. Prueba de aceptación en el lugar de instalación.
UDAF: *Unidirectional Air Flow.* Flujo de aire unidireccional. Reemplaza al término de flujo laminar empleado anteriormente.
WHO: *World Health Organization.* Organización Mundial de la Salud.

Otros términos:

At rest. En estado de reposo.
Interlockeado de puertas: Significa que, en un sello dotado de 2 puertas, no puede abrirse una de ellas hasta que no esté cerrada la otra.
Mix ups: Mezclas.
Overkill: Se refiere a aquellos procesos de esterilización donde el SAL es superior a 10^{-6}.

Capítulo VI.9

Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología

Subcomisión de Bioseguridad y Biocustodia. AAM.

Silvina Fernández Giuliano, Susana Fink, Susana Molgatini, Leonora Nusblat y Sandra Pampuro

Introducción

Definiciones

Buenas prácticas de laboratorio

Riesgos en el laboratorio

Grupos de riesgo de los agentes biológicos

Niveles de Bioseguridad

Bibliografía

Introducción

La seguridad y en particular la bioseguridad o seguridad biológica son aspectos de permanente interés para todas las personas que trabajan en la industria de medicamentos, cosméticos, laboratorios de análisis clínicos, institutos biomédicos y todos los laboratorios afines.

La bioseguridad es el conjunto de principios de contención, técnicas y prácticas que son implementadas con el fin de evitar o reducir la exposición no intencional a agentes biológicos y toxinas o su liberación accidental.

Las pautas de bioseguridad constituyen un conjunto de medidas que deben ser adoptadas con el fin de evitar que se produzcan accidentes que afecten al personal, la comunidad o el medio ambiente con la finalidad de reducir a un mínimo aceptable el riesgo inherente a la manipulación de material biológico.

El personal del laboratorio de microbiología no sólo está expuesto al riesgo de accidentes e incidentes por la manipulación del material biológico sino también a riesgos de tipo físico y químico, de acuerdo a los reactivos, materiales y equipamientos utilizados, las condiciones laborales y los procedimientos que se realicen.

Es importante la formación, capacitación, monitoreo y evaluación continua del personal para el desarrollo de las tareas en condiciones seguras.

Definiciones

Accidente: Todo acontecimiento, suceso o evento, repentino y violento, no planeado y sin intención, de consecuencias generalmente inmediatas, que ocasiona pérdidas materiales o produce un daño un daño a personal o al medio ambiente.(1)

Agente biológico: es cualquier microorganismo, virus, sustancia infecciosa, o producto biológico que puede ser diseñado como resultado de la biotecnología, o cualquier componente de cualquiera de tales microorganismos, virus, sustancia infecciosa o producto biológico de origen natural o sintético, capaz de causar muerte, enfermedad u otro mal funcionamiento en un ser humano, un animal, una planta u otro organismo vivo; o causar el deterioro de los alimentos, el agua, equipos, suministros o materiales de cualquier tipo; o causar la alteración perjudicial del medio ambiente.(2)

Barrera Primaria: Primer nivel de barreras físicas diseñado para contener patógenos y toxinas y prevenir su liberación. Esto se logra mediante la provisión de un dispositivo, equipo u otra estructura física situada entre el

material infeccioso o toxinas y el individuo, el entorno de trabajo u otras áreas dentro de la zona de contención. Los ejemplos incluyen gabinetes de seguridad biológica, cajas de guantes y microaisladores de animales. En los cubículos de animales, la habitación en sí misma proporciona una contención primaria, y el equipo de protección personal sirve como protección primaria contra la exposición.[3]

Barrera Secundaria: protección del ambiente externo al laboratorio de la exposición a materiales infecciosos y es proporcionada por una combinación de diseño de instalaciones y prácticas operativas.[4]

Biocustodia: describe las medidas de protección, control y responsabilidad con respecto a los agentes biológicos y toxinas, para prevenir su pérdida, robo, mal uso, desviación, el acceso no autorizado y la liberación intencional no autorizada.[5]

* En la actualidad, el término biocustodia reemplaza al de bioprotección. Este término fue acuñado en el seno de la Reunión de Expertos de la Convención sobre la Prohibición del Desarrollo, la Producción y el Almacenamiento de Armas Biológicas y Toxínicas y sobre su Destrucción, celebrada en la sede las Naciones Unidas en Ginebra, Suiza en el año 2008, dado que las comunidades hispanoparlantes consideraron que era un término más correcto y que además reflejaba con más exactitud lo que el vocablo inglés "biosecurity" significa.

Bioseguridad o Seguridad Biológica: la bioseguridad en el laboratorio describe los principios de contención, las tecnologías y procedimientos que se aplican para prevenir la exposición no intencionada a agentes biológicos y toxinas o su liberación accidental.[6]

Buenas prácticas microbiológicas de laboratorio: métodos de trabajo aplicados para eliminar o minimizar la exposición a los agentes biológicos por ejemplo a través de la exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculación accidental.[7]

Contención: combinación de parámetros de diseño físico y prácticas operacionales que protegen al personal, al ambiente inmediato de trabajo y a la comunidad de la exposición a material biológico.[6]

Cultivo: Propagación in vitro de microorganismos, células de tejido, u otras formas de vida bajo condiciones controladas (por ejemplo, temperatura, humedad, nutrientes) para generar mayor número o una concentración mayor de los organismos/células. [6]

Endémico: presencia constante de un agente o condición de salud dentro de un área geográfica o población determinada; también puede referirse a la prevalencia habitual de un agente o condición.

Fuente (de infección): persona, animal, objeto o sustancia desde la que se transmite un agente infeccioso a un host.[8]

Incidente: Acontecimiento no deseado ni previsto, y que teniendo el mismo mecanismo de acción y el mismo potencial para producir daños o lesiones a las personas o instalaciones que un accidente, por casualidad, no los produce.[1]

Infección: capacidad de un agente infeccioso para causar la infección, medida la proporción de personas expuestas a un agente infeccioso que se infecta.[8]

Línea Celular: Una población de células con características genéticas uniformes derivadas de una sola célula u tejido homogéneo proporcionado por una fuente de origen humano o animal (incluido aviar, anfibio o insecto). Las líneas celulares primarias se cultivan a partir de una muestra primaria derivada de un único sujeto clínico o de investigación. Las líneas celulares inmortalizadas pueden proliferar indefinidamente debido a una mutación, ya sea a través de mutaciones espontáneas resultantes de la infección por un virus, o mediante modificación genética usando tecnología de ADN recombinante.[3]

Material biológico: Microorganismos patogénicos y no patogénicos, proteínas y ácidos nucleicos, así como todo material de origen biológico que pueda contener microorganismos, proteínas y ácidos nucleicos o partes de ellos. Ej. Incluyen, pero no se limitan a, bacterias, virus, hongos, priones, toxinas, organismos genéticamente modificados, ácidos nucleicos, muestras de tejidos, especímenes para diagnósticos, vacunas vivas y aislamientos de un patógeno (cultivo, suspensión, esporas purificadas).[3]

Microorganismo: Una entidad microbiológica celular o no, capaz de replicar o transferir el material genético y que no puede ser detectada razonablemente por el ojo humano desnudo. Los microorganismos incluyen bacterias, hongos, virus y parásitos, y pueden ser patogénicos o no patogénicos por naturaleza.[3]

Patogenicidad: capacidad de un agente para causar enfermedad después de la infección, medido como la proporción de personas infectadas por un agente que después experimenta la enfermedad.[8]

Peligro: fuente o situación potencial de daño en términos de lesiones o efectos negativos para la salud de las personas, daños a la propiedad, daños al entorno del lugar de trabajo o una combinación de éstos.[9]

Precauciones (universales) estándares: Este sistema fue establecido por el Centro de Control de Enfermedades (C.D.C) de Atlanta, en 1987, a través de un grupo de expertos quienes desarrollaron guías para prevenir la transmisión y control de la infección por VIH y otros patógenos provenientes de la sangre hacia los trabajadores de la salud y sus pacientes. En el mismo, se recomendó que todas las Instituciones de Salud adoptaran una política de control de la infección, que denominaron "Precauciones Universales". Se entienden como Precauciones Universales al conjunto de técnicas y procedimientos destinados a proteger al personal que conforma el equipo de salud de la posible infección con ciertos agentes, principalmente Virus de la Inmunodeficiencia Humana, Virus de la Hepatitis B, Virus de la Hepatitis C, entre otros, durante las actividades de atención a pacientes o durante el trabajo con sus fluidos o tejidos corporales. Las precauciones universales parten del siguiente principio: "Todos los pacientes y sus fluidos corporales independientemente del diagnóstico de ingreso o motivo por el cual haya entrado al hospital o clínica, deberán ser considerados como potencialmente infectantes y se debe tomar las precauciones necesarias para prevenir que ocurra transmisión.[10]

Transmisión (de infección): cualquier modo o mecanismo por el cual un agente infeccioso se propaga a un huésped susceptible).[8]

Buenas prácticas de laboratorio

Independientemente del tipo de riesgo que posea el laboratorio, existen Prácticas Estándar que deben aplicarse en todos los casos:

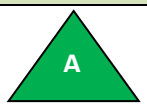
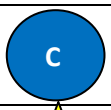
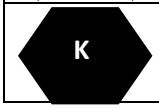
- Deberá contarse con procedimientos operativos estándares (POEs) para todas las actividades.
- El acceso al laboratorio es limitado o restringido
- Las personas deben lavarse las manos antes de colocarse y luego de quitarse los guantes, y antes de retirarse del laboratorio.
- No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto (su uso en el laboratorio no es recomendable) o maquillarse en las áreas de trabajo.
- Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
- Está prohibido pipetear con la boca. Deben utilizarse dispositivos auxiliares para tal fin.
- Se deben establecer procedimientos para el manejo seguro de objetos cortopunzantes.
- Todas las prácticas deben realizarse con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
- Las superficies de trabajo deben descontaminarse antes y después de la realización de cada práctica y luego de cualquier tipo de derrame de material biológico.
- Debe contarse con una política de gestión de residuos para dar cumplimiento a los marcos regulatorios correspondientes.
- Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio.
- Debe contarse con un programa de control de plagas.
- El personal del laboratorio debe ser advertido acerca de todos los riesgos asociados al ámbito de trabajo.
- El personal deberá utilizar los elementos de protección personal (guantes, guardapolvo de mangas largas, calzado cerrado, protectores oculares, protectores respiratorios, etc.) adecuados a la práctica que realiza.
- No usar la indumentaria de trabajo y/o los equipos de protección individual fuera de las áreas de trabajo.

- No oler directamente los reactivos y materiales.
- Almacenar muestras y reactivos en heladeras distintas.
- Colocar carteles indicadores de riesgo y elementos de protección personal requeridos en lugares claramente visibles.
- Debe contarse con procedimientos para situaciones de emergencia y contingencia incluyendo la declaración obligatoria de todo accidente en el ámbito de trabajo.

Riesgos en el laboratorio

En los laboratorios existen diversos riesgos laborales, de tipo físico, eléctrico, de incendio, químico y biológico.

Tabla 1: Clases de fuego y agentes extintores:

CLASES DE FUEGO		AGENTES EXTINTORES						
CLASE DE FUEGO	MATERIALES COMBUSTIBLES	ABC	CO_2	ESPUMA AFFF	AGUA	HALO-CLEAN	POLVOS SECOS	ACETATO DE POTASIO
	Papel, madera, textil, viruta, goma, etc.	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI
	Solventes, nafta, pintura, otros líquidos inflamables	SI	SI	SI	NO	SI	NO	SI
	Equipos eléctricos conectados: motores	SI	SI	NO	NO	SI	NO	SI
	Metales combustibles: Sodio, potasio, magnesio, etc.	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO
	Grasas y aceites de cocción en cocina	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI

Riesgo físico: está relacionado con los factores ambientales (ruido, iluminación, radiación, temperatura, vibración) que pueden actuar sobre el operador produciendo un efecto nocivo. Se deben generar condiciones de trabajo para que estos parámetros queden dentro de lo establecido por la Ley 15189 [11].

Riesgo eléctrico: Para evitar el riesgo eléctrico se deben tomar una serie de precauciones:

- No tocar elementos eléctricos con las manos húmedas.
- Evitar las conexiones precarias y el uso de alargues y adaptadores.
- Asegurarse de que los equipos y la instalación eléctrica estén en buen estado y que haya conexión a tierra.
- No sobrecargar los circuitos eléctricos.
- Dado que los dispositivos eléctricos pueden producir chispas, no deben utilizarse cerca de gases o líquidos inflamables o volátiles.
- Nunca deben colocarse líquidos inflamables en un refrigerador doméstico. La chispa que genera la llave de luz activada con la puerta puede encender gases atrapados en la unidad y provocar una explosión y un incendio. Se deben usar refrigeradores especiales al guardar sustancias químicas con potencial de explosión.

Riesgo de incendio: Según los materiales combustibles presentes se definen distintas clases de fuego. En cada caso hay diversos agentes recomendables para la extinción, tal como se resume en la Tabla 1.

Riesgo químico: Se deben conocer las características de los reactivos químicos para saber cómo trasladarlos, almacenarlos, manipularlos y descartarlos. Estas características incluyen: toxicidad, corrosividad e inflamabilidad. Los accidentes químicos se pueden producir por inhalación, ingestión o contacto.

Cada vez que se adquiera un nuevo producto químico deberá obtenerse la Ficha u Hoja de datos de seguridad del producto químico (SDS – Safety Data Sheet). Esta deberá ser leída, comprendida y archivada de modo accesible.

Desde el año 2010 está en vigencia el sistema globalmente armonizado que establece la uniformidad de estas hojas de datos con el siguiente contenido:

1) Identificación de la sustancia o preparado y de la sociedad o empresa.
2) Composición/información sobre los componentes.
3) Identificación de los peligros.
4) Primeros auxilios.
5) Medidas de lucha contra incendios.
6) Medidas en caso de vertido accidental.
7) Manipulación y almacenamiento.
8) Controles de la exposición/protección individual.
9) Propiedades físicas y químicas.
10) Estabilidad y reactividad.
11) Información toxicológica.
12) Información ecológica.
13) Consideraciones relativas a la eliminación.
14) Información relativa al transporte.
15) Información reglamentaria.
16) Otra información.

Es importante destacar que las hojas de datos deben estar actualizadas ya que puede haber cambios en el conocimiento sobre posibles efectos dañinos de estos compuestos.

Existen diversas fuentes de consulta para las mismas:

- MSDS Europe: http://www.msds-europe.com/id-595-la_ficha_de_datos_de_seguridad_incluira.html
- Instituto de Salud e Higiene del Trabajo de España: http://www.insht.es/portal/site/Insht/menuitem.a82abc159115c8090128ca10060961ca/?vgnextoid=4458908b51593110VgnVCM100000dc0ca8c0RCRD

En nuestro país se encuentra disponible en la web la Guía de respuesta a emergencias químicas (CIQUIME), diseñada inicialmente para el transporte, que brinda también información de utilidad.
http://www.ciquime.org/descargas.html

Además, en el trabajo se deberán respetar siempre las concentraciones máximas permisibles establecidas por la Ley 19587.

Riesgo biológico: La evaluación del riesgo biológico es uno de los pilares de la bioseguridad.

En el proceso de evaluación de riesgo deben considerarse diversos factores, entre los que se incluyen:

- Características del material biológico
- Características de diseño de laboratorio
- Medidas de mitigación existentes en el ámbito de trabajo (ej.: barreras primarias y secundarias)
- Tipo de procedimientos y actividades realizadas (ej.: producción de aerosoles, centrifugación, etc.)
- Escala de trabajo (la concentración del agente y el volumen del material concentrado que va a manipularse.).

El proceso de evaluación de riesgo biológico debe realizarse en forma multidisciplinaria con la participación de personal idóneo.

En base a la información obtenida durante dicho proceso se establecerán las condiciones de trabajo seguro y los elementos de protección personal y colectiva (ej.: cabinas de seguridad biológica, centrífugas con tapas de seguridad) necesarios.

Todo el personal que se desempeñe en el ámbito de trabajo deberá estar debidamente capacitado y deberá demostrar ser competente.

Grupo de Riesgo de los agentes biológicos

Se entiende como Grupo de Riesgo a cada una de las categorías en que se clasifica a los agentes biológicos en base a sus características, incluyendo la patogenicidad, virulencia, riesgo de dispersión y accesibilidad a un tratamiento efectivo profiláctico o terapéutico, que describe el riesgo a la salud de individuos y la población, así como también la salud y población animal.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado una clasificación de grupos de riesgo para el laboratorio que describe 4 grupos generales de riesgo basado en estas características y en su vía de transmisión natural.

- **Grupo de riesgo 1:** (riesgo individual y poblacional escaso o nulo).
  Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
- **Grupo de riesgo 2:** (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo).
  Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
- **Grupo de riesgo 3:** (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo).
  Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
- **Grupo de riesgo 4:** (riesgo individual y poblacional elevado).
  Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Nuestro país no posee un listado oficial de clasificación de agentes biológicos. Se toman como referencia listados de distintas organizaciones. Algunos de ellos son:

- Asociación Mexicana de Bioseguridad: https://seguridadbiologica.blogspot.com.ar/p/hsp.html
- Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo:

  http://www.insht.es/portal/site/RiesgosBiologicos/menuitem.70332c951b3ee1d06a14cc1c180311a0/?vgnextoid=40b774f20801d310VgnVCM1000008130110aRCRD
- American Biological Safety Association: https://my.absa.org/tiki-index.php?page=Riskgroups
- Public Health Agency of Canada: http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/index-eng.php
- CDC Manual “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories” (BMBL) 5th Edition, Sección VIII: http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm
- Comparación de hojas de seguridad de patógenos [(12)]
- Norma IRAM 80059:2017 [(13)]. Clasificación de agentes biológicos infecciosos por grupo de riesgo para humanos y animales y su relación con los niveles de bioseguridad según la actividad desarrollada.

Niveles de Bioseguridad:

Los grupos de riesgo son distintos a los niveles de bioseguridad (NB).

Los cuatro niveles de bioseguridad, designados con números del 1 al 4, se basan en combinaciones de práctica y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad (barreras primarias) e instalaciones del laboratorio (barreras secundarias). Cada NB amplía los requerimientos del nivel anterior para proporcionar contención adicional. En la Tabla 2 se mencionan los requisitos de cada NB.
De este modo, la asignación de un NB tiene en consideración el material biológico manipulado, las instalaciones y el equipo disponible, las prácticas y los procedimientos necesarios para trabajar con seguridad en el laboratorio.

El nivel de bioseguridad asignado a un trabajo concreto dependerá del juicio profesional basado en la evaluación del riesgo, y no en la asignación automática de un nivel de bioseguridad con arreglo al grupo de riesgo particular al que pertenezca el agente patógeno con el que se va a trabajar.

Actualmente el criterio es, tal como se describe en el reciente trabajo de Kojima [14], determinar todos los requerimientos y las medidas de mitigación, condiciones y equipamiento necesarios, basándose en la evaluación de riesgo y la evidencia conocida, para trabajar de manera segura.

Entonces, no sólo se tendrá en cuenta el grupo de riesgo del microorganismo, sino además otros factores, con el fin de determinar el NB más apropiado para su manipulación. Por ejemplo, un agente patógeno asignado al grupo de riesgo 2 en general requerirá instalaciones, equipo, prácticas y procedimientos de un NB2 para trabajar sin riesgo. Sin embargo, si se realizan experimentos que producen alta generación de aerosoles o propagación de microorganismos en elevadas concentraciones, se debe trabajar en un NB3 para proporcionar el grado necesario de seguridad y para garantizar el entorno de trabajo seguro.

Tabla 2: Resumen de los requisitos del laboratorio por nivel de bioseguridad

REQUISITO		NIVEL DE BIOSEGURIDAD			
		1	2	3	4
Aislamiento(a) del laboratorio		No	No	Sí	Sí
Recinto que pueda precintarse para descontaminación		No	No	Sí	Sí
Ventilación:	• Flujo de aire hacia el interior	No	Conveniente	Sí	Sí
	• Sistema de ventilación controlada	No	Conveniente	Sí	Sí
	• Salida de aire con filtro HEPA	No	No	Sí/No	Sí
Entrada de doble puerta		No	No	Sí	Sí
Cámara de cierre hermético		No	No	No	Sí
Cámara de cierre hermético con ducha		No	No	No	Sí
Antesala		No	No	Sí	–
Antesala con ducha		No	No	Sí/No(b)	No
Tratamiento de efluentes		No	No	Sí/No(b)	Sí
Autoclave:	• En la instalación	No	Conveniente	Sí	Sí
	• En el recinto de trabajo	No	No	Conveniente	Sí
	• De doble puerta	No	No	Conveniente	Sí
CSB		No	Conveniente	Sí	Sí
Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal (c)		No	No	Conveniente	Sí

(a) Aislamiento ambiental y funcional respecto del tráfico general.
(b) Según cuáles sean los agentes empleados en el laboratorio.
(c) Por ejemplo, ventana, sistema de televisión en circuito cerrado, comunicación en dos sentidos.
HEPA: filtración de partículas aéreas de gran eficiencia (del inglés High-Efficiency-Particulate Air).
CSB: cámara de seguridad biológica.

Bibliografía

1 Glosario Temático de la Salud del Trabajador en el Mercosur. Comisión Intergubernamental de Salud Ambiental y del Trabajador (CISAT). Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2009

2 PART 331— Possession, use and transfer of select agents and toxins. Select Agents Regulations 7 C.F.R. Part 331

3 CBH - Canadian Biosafety Handbook. 2nd Edition. Public Health Agency of Canada. March 2016

4 English-Russian harmonized dictionary of biological safety and security. Center of Modern Medical Technogies, TEMPO, 2010

5 Adaptado de "Biorisk Management Laboratory Biosecurity Guidance", September 2006. OMS (WHO/CDS/EPR/2006.6)

6 CBSG. Canadian Biosafety Standards and Guidelines. 2nd Edition, May 2016

7 Adaptado de "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio", 3ra. Edición, 2005. OMS

(WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11)

8 Principles of Epidemiology in Public Health Practice, Third Edition. An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). US, May 2012

9 Adaptado de OHSAS 18001:2007 Sistema de Gestión en Seguridad y Salud Ocupacional – Requisitos

10 Center for Control Diseases (CDC). Atlanta, US. 1987

11 Ley 19587 Ley de Higiene y Seguridad en el Trabajo, sus modificatorias y normas complementarias

12 Deqiao Tian, Tao Zheng. Comparison and Analysis of Biological Agent Category Lists Based On Biosafety and Biodefense. 2014. PLOS One 1 (6):1-6

13 Norma IRAM 80059:2017 "Clasificación de agentes biológicos infecciosos por grupo de riesgo para humanos y animales y su relación con los niveles de bioseguridad según la actividad desarrollada".

14 Kazunobu Kojima, Catherine Makison Booth, Kathrin Summermatter, Allan Bennett, Marianne Heisz, Stuart D. Blacksell, Michelle McKinney. Risk-based reboot for global lab biosafety. 2018. Science 360 (6386): 260-262

Publicado y editado en Buenos Aires

Año 2019

Por:

Subcomisión de Buenas Prácticas

de la

División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC).

Distribución a través de

www.aam.org.ar

ISBN 978-987-46701-4-4