

The background of the cover is a photograph of laboratory glassware. In the foreground, there are two large, clear glass beakers filled with a bright orange liquid. Behind them, several smaller glass vials or test tubes are visible, some containing the same orange liquid. The background is a textured, mottled blue and green surface. A semi-transparent dark blue rounded rectangle is overlaid in the center, containing the title and authors' names in white text.

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA APLICADA A LAS INDUSTRIAS FARMACÉUTICA, COSMÉTICA Y DE PRODUCTOS MÉDICOS

Héctor Cerra
María Cristina Fernández
Celina Horak
Mónica Lagomarsino
Graciela Torno
Esteban Zarankin

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA APLICADA A LAS INDUSTRIAS FARMACÉUTICA, COSMÉTICA Y DE PRODUCTOS MÉDICOS

Editores:

Héctor Cerra
María Cristina Fernández
Celina Horak
Mónica Lagomarsino
Graciela Torno
Esteban Zarankin



División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos
Subcomisión de Buenas Prácticas



ISBN 978-987-26716-3-1

*La recompensa del trabajo bien hecho es la oportunidad de
hacer más trabajo bien hecho.*

Jonas Edward Salk

BIOGRAFÍAS DE LOS AUTORES

Néstor Oscar Aversa: Bioquímico egresado de la Universidad de Buenos Aires. Ingeniero Certificado en Calidad (American Society for Quality - ASQ), Miembro Senior de la ASQ, Diplomatura en Gestión de la Calidad (IEEC). Actual Director de Espiral de Calidad, Consultoría y Capacitación en Calidad. Previamente y durante casi 35 años ininterrumpidos ha desempeñado funciones Gerenciales de Calidad en Alcon Laboratorios, Farmasa Farmacéutica Argentina, Astra S.A.P.F. y Q., G&M S.A. y Gador S.A. Ha realizado auditorías en Uruguay, Chile, Colombia, Paraguay y México. Fue conferenciante en Congresos ASQ (USA) y AOAC (Brasil) y ha dictado cursos en Argentina, Uruguay, Paraguay sobre variados temas como Aseguramiento de la Calidad en Laboratorios Analíticos y Microbiológicos, Planeamiento Estratégico de la Calidad, Costos de Calidad, Reclamos, Sistema CAPA, Control Estadístico de Procesos, Diseño de Productos, Análisis de Riesgo, Agua de Uso Farmacéutico y Formación de auditores, entre otros temas.

Nora Estela Carbone: Es Farmacéutica graduada en 1989 y Bioquímica graduada en 1990, ambas en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Es especialista en Esterilización, título recibido también en la UBA en 1997.

Es Jefe de Esterilización de la Fundación Favoloro - Hospital universitario desde marzo del 2010.

Es docente de la materia "Práctica Hospitalaria I" de la Carrera de Medicina de la Universidad Favoloro. Es docente invitada de la materia "Esterilización I" de la Carrera de Especialización en Esterilización de la Universidad Nacional de Córdoba.

Es Miembro de la Subcomisión de Productos Médicos de la Farmacopea Argentina.

Susana Carnevali: Bioquímica (UBA). Especialista en Calidad Industrial (Univ. Nacional San Martín). Diplomada en Constructivismo y Educación (FLACSO Argentina y Univ. Autónoma de Madrid). Profesora de Microbiología General y Alimentaria y de Bromatología y Tecnología de los Alimentos en el IUCS, Fundación Barceló. Investigadora categorizada de la misma institución. Asesora metodológica en la elaboración del Trabajo Final de Investigación de la Carrera de Nutrición. Evaluadora Coordinadora y Evaluadora Técnica en Microbiología y Ensayos Biológicos para Laboratorios de Ensayo. Inspectora de Buenas Prácticas de Laboratorio (OECD) y Miembro del Comité de Ensayos Químicos, Biológicos y de Buenas Prácticas de Laboratorio del Organismo Argentino de Acreditación. Autora de capítulos de libros y de artículos científicos publicados en Revistas nacionales e internacionales sobre calidad, educación e inocuidad de los alimentos. Disertante en Jornadas y Congresos Científicos. Mención honorífica en el VI Congreso Iberolab, 2011. 2do. Premio en el Área Educación Inicial. Concurso Docentes que cuentan Educambio 2007. Miembro de diversas asociaciones profesionales.

Héctor Cerra: Licenciado en Tecnología Industrial de los Alimentos, egresado de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Comenzó su actividad profesional en 1984 en el Instituto Nacional de Medicamentos realizando una beca en el Departamento de Biología. Se ha desempeñado como Ayudante de primera y Jefe de Trabajos Prácticos en las cátedras de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UADE. A partir de 1986 y hasta el presente trabaja en Laboratorios Boehringer Ingelheim donde se desempeña como Supervisor de Microbiología.

Desde 1983 es miembro de la Asociación Argentina de Microbiología (AAM) ocupando varios cargos en la División Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC) y en la Subcomisión de Buenas Prácticas. Es miembro de la Subcomisión de Microbiología de la Farmacopea Argentina. Fue miembro del Comité Organizador del 1° y 2° Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos (CLAMME).

Carlos Chiesa: Bioquímico UBA. Consultor independiente especializado en Planeamiento y Desarrollo de programas de Calidad orientados a alcanzar los requerimientos de las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) nacionales e internacionales aplicadas a empresas de la industria farmacéutica, cosmética, farmoquímica, alimenticia y veterinaria.

Previo a su actividad independiente, desempeñó funciones gerenciales en Gador SA (División Farmoquímica), Grupo Sintyal, American Cyanamid (Lederle), Laboratorios Glaxo (Argentina e Inglaterra), entre otras importantes empresas. Recibió entrenamiento en Sistemas de Calidad (GMP) en Inglaterra (Glaxo – Casa Matriz) durante un año. Atendió inspecciones de la FDA en Argentina con resultados muy satisfactorios.

En el ámbito académico se desempeñó como docente en: Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA (Ex Jefe de Trabajos Prácticos).

Mino Covo: Es ex Presidente de Filtrar Ingeniería SA, de Microfilter SA, de Mino Covo SA (convertida a Pall Technologies SA), ex Presidente de Capítulo Argentino de Filtration Society, y ex representante de The Baker Company, Cambridge Filter Corporation, Finn Aqua, Pall Corporation, PMS, ATI, Donaldson, etc. Cursos realizados en Harvard University Air Cleaning Laboratory, en Eagleson Institute Maine (USA), ISPE (USA), PDA (USA), etc. Dictó cursos desde 1974 para la Sociedad Argentina de Farmacia y Bioquímica (SAFyBI), ISPE, Universidad de Buenos Aires, Universidad de Sao Paulo, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) Santiago de Chile, Instituto Nacional de los Medicamentos (INAME), ANMAT, etc. Publicó varios libritos como “El Filtrado Industrial del Aire”, “Filtragem de Ar” (Brasil), “Filtración de aire para la industria farmacéutica”, “Filtración de fluidos”, “Apuntes sobre filtración de fluidos”, y numerosos artículos en revistas técnicas. Es socio vitalicio de ASHRAE American Society of Air Conditioning Engineers.

Miguel D’Aquino: Profesor Emérito de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB) de Universidad de Buenos Aires (UBA). Se graduó como Dr en Bioquímica y Farmacia en la UBA. Fue Profesor Adjunto y Asociado de Microbiología; Prof. de Higiene y Sanidad; Prof. de Métodos Microbiológicos aplicados al Control de Calidad, y Prof. de Microbiología de Alimentos I, en la carrera Ingeniería de alimentos UBA Luján. Fue director del Departamento de Sanidad y Consejero Titular de la FFyB; Director del Área de Carreras de Especializaciones (Escuela de Graduados de FFyB, UBA); Director de Carrera de Especialización PRODUCCIÓN DE COSMÉTICOS y de numerosos cursos de postgrado; y Director de numerosos subsidios de investigación de UBA y CONICET. Fue además Director de 11 Tesis de doctorados finalizadas y 1 en fase de finalización. Publicó los libros: “Desinfección” EUDEBA 1995 Co-autor R. Rezk; “Saneamiento-Higiene y Sanidad”. Ed. Macchi, 1999 y “El saneamiento al alcance de todos” (2004 inédito); así como capítulos en otros libros. Publicó más de 120 trabajos en revistas nacionales y extranjeras. Patentó “Superficies Antimicrobianas”. Acta N° P-070101064 del 16/3/2007.

José Julio Degrossi: Farmacéutico (UBA 1994). Especialista en industrias bioquímico farmacéuticas con orientación garantía y desarrollo de calidad (UBA 2000). Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área Microbiología (2010).

Docente auxiliar de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA desde el 1994. Participa en el dictado de la materia Higiene y Sanidad y de cursos y materias de postgrado (Métodos microbiológicos aplicados al control de calidad, Microbiología sanitaria, entre otros). Desde el programa de transferencia tecnológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA realiza análisis microbiológicos y ensayos de eficacia de desinfección para terceros.

Posee más de 60 presentaciones en reuniones científicas y 23 artículos publicados en revistas nacionales e internacionales. Participa del Grupo de Trabajo en *Burkholderia cepacia* dependiente de la Asociación Argentina de Microbiología y del International *Burkholderia cepacia* Working Group.

Claudio Denoya, Ph.D.: He is a Senior Director of Research and Development, Biopharma Group, Life Sciences Division, Pall Corporation. Responsibilities include New Technologies, Rapid Microbiology, Process Development, Validation, Guidelines, and Technical Customer Support. Dr. Denoya’s previous position was as a Research Fellow and Group Leader of the Microbiological Technology Assessment group at Pfizer Global R&D. He is also an Adjunct Professor at the Department of Molecular and Cell Biology, Univ. of Connecticut. Prior to Pfizer, he worked in *Bacillus subtilis* molecular genetics at the Public Health Research Institute, and before that, he worked in animal viruses and vaccine production, and he formed and led a genetic engineering group at the biotech company BioSidus, Argentina. He has authored over 80 patents, book chapters, and journal articles and 200+ technical presentations. Dr. Denoya holds a Ph.D. in Biochemistry and Molecular Genetics of Animal Viruses, a M.S. in Biochemistry and Microbiology, and a B.S. in Clinical Biochemistry from the University of Buenos Aires.

Patricia Domínguez: Bioquímica (1982) y Farmacéutica (1986) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) Especialización en Industrias-Bioquímico-Farmacéuticas especialización Desarrollo y Garantía de Calidad (UBA 1999). Quality Assurance (UB 2002)). DGQ-QM (INTI 2005). Certificate of Specialist Microbiologist in Pharmaceutical and Medical Devices of the National Registry of Certified Microbiologists of the American College of Microbiology USA. Concurrente al Servicio de Bacteriología del Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Escuela José de San Martín (1983 -1985). Becaria en el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de

Bacteriología y Bromatología (INFYB hoy INAME 1985-1987). Supervisora Laboratorio de Control de Calidad de Organon Argentina S.A (1987-1995). Coordinadora de Microbiología y Documentación en Bayer S.A (1995-2005). Actualmente y desde 2005, Jefa de Documentación/ GMP QA y Co-Directora Técnica en Bayer S.A. Miembro de ASM, ASQ, AAM, SAFYBI.

Maria Cristina Fernandez: Bioquímica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Fue responsable del Sector Productos no estériles en el Departamento de Microbiología e Inmunología del Instituto Nacional de Medicamentos (1984-2010). Fue Auditora Técnica en la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (2010-2011). Actualmente forma parte del Departamento de Estudios y Proyectos de la ANMAT. Posee treinta publicaciones y posters en Congresos nacionales e internacionales. Es co-autora de cinco capítulos de manuales y libros. Es coordinadora de la subcomisión de Buenas Prácticas de la Asociación Argentina de Microbiología. Es docente de la Cátedra de Microbiología y del curso para graduados "Control Microbiológico aplicado al Control de Calidad" de la FFyB de la UBA. Ha participado como disertante y coordinadora de numerosas actividades relacionadas con Microbiología de medicamentos, cosméticos y alimentos. Es miembro del Comité de Microbiología y Presidente de la Sección Latinoamericana de la AOAC International.

Mirta Franco: Doctora en Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Ingresó en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB) -UBA- en 1969. Ocupó allí los cargos de Subsecretaria de Ciencia y Técnica (1994-1998), Secretaria de Ciencia y Técnica (1998-2006) y Secretaria de Postgrado (2006-2014). Actualmente es Profesora Titular Regular de Microbiología, a cargo de la Cátedra de Microbiología, Directora de las Carreras de Especialización en Esterilización para Farmacéuticos y Directora de cursos de postgrado sobre Microbiología aplicada a la esterilización y al análisis de medicamentos. En la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán fue Directora de la Carrera de Especialización en Esterilización (2001-2012). Es autora de capítulos de libros sobre Nutrición, Crecimiento y Metabolismo Bacterianos y Respuesta inmune a las infecciones bacterianas, Fuentes de contaminación e infección, etc. Es coautora de publicaciones científicas en revistas nacionales y extranjeras con referato y de presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas, principalmente sobre factores de virulencia bacterianos y prevención de infecciones. Es Directora de Tesis doctorales en el área Microbiología.

Beatriz Nélica Giampaolo: Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, profesional de INAME desde 1979, actualmente Jefe de Servicio del Servicio de Ensayos de Pureza, del 1990 al 2007 Subrogante del Departamento de Productos Biológicos. Inspectora INAME, especialista en Productos Biológicos y experta en Endotoxinas Bacterianas, acreditada en PICs y MERCOSUR. Actuación en la Farmacopea Argentina 7^{ma} ed. como Coordinadora de la Subcomisión de Productos y Métodos Biológicos; actualmente como miembro de la Subcomisión de Biotecnología. Redacción de normas de SPGV, dispositivos médicos y registro de PB. Ha coordinado, dictado y participado en más de 25 cursos, 5 publicaciones y más de 35 presentaciones a simposios y congresos en los temas de su especialidad y BPM en el ámbito nacional e internacional. Actuación en el comité de Expertos de PIC's de Sangre y Tejidos (Terapia Celular y de Tejidos) en la Reunión de Autoridades Nacionales Reguladoras de Productos Biológicos en Latino América y el Caribe en la Reunión de "Productos Biológicos/ Biotecnológicos".

Celina Horak: Licenciada en Tecnología Industrial de los Alimentos (Universidad Argentina de la Empresa) y Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biotecnología. Trabajó en el Instituto Nacional de Medicamentos, de la ANMAT, desde 1992 hasta 1993, desarrollando tareas de Control higiénico y de esterilidad de fármacos, productos médicos y alimentos. Desde Marzo de 1993 a la actualidad, desarrolla sus actividades en la Comisión Nacional de Energía Atómica, como Jefe División Aplicaciones Biológicas. Experta del Organismo Internacional de Energía Atómica en Sistema de gestión de calidad en Bancos de Tejidos y Esterilización por irradiación. Es docente invitada de la materia "Esterilización II" de la Carrera de Especialización en Esterilización de la Universidad Nacional de Córdoba. Docente de la carrera de posgrado Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares (UNSAM-Instituto Beninsom, CNEA). Participación en el subcomité de IRAM sobre Esterilización de Productos para el Cuidado de la Salud. Miembro de la Subcomisión Buenas Prácticas de Microbiología de la AAM; secretaria de la Asociación Argentina de Bancos de Tejidos y de la AATA.

Sergio Iglesias: Es Licenciado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, especializado en Biología Molecular. Seminario de Licenciatura “Producción de Antígenos Recombinantes de *Trypanosoma cruzi* y su Potencial en el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas” (Dir: Alberto Frasch). Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar. Efectuó el curso de Posgrado de “Quality Assurance” de la Universidad de Belgrano. Fue docente de Química Biológica (FCEN-UBA). Publicó en revistas nacionales e internacionales. Participó y dictó conferencias en congresos como CLAMME I y II, SAFyBI, y 1er Congreso Científico Nacional del Laboratorio de Salud de Guatemala. Dicta cursos en la Asociación Química Argentina y se desempeña como 2do. Jefe de Microbiología en GADOR SA. Anteriormente fue Encargado de Desarrollo Tecnológico en Biotecnología en GADOR SA., participando del desarrollo de un equipo diagnóstico con antígenos recombinantes para Chagas.

Luis Jiménez: En la actualidad ocupa la posición de profesor asistente de Microbiología en el Bergen Community College y de profesor adjunto de Biología en la Universidad Fairleigh Dickinson, ambos ubicados en el norte de Nueva Jersey, Estados Unidos de América. También es consultor de aplicaciones biotecnológicas a los problemas ambientales, clínicos, e industriales. Tiene 17 años de experiencia en las industrias biotecnológica y farmacéutica, en las cuales ha participado en el desarrollo de varios productos para aplicaciones clínicas y ambientales. La experiencia del Dr. Jiménez en estas áreas se refleja en 51 publicaciones, 8 capítulos de libros, 1 tomo, 1 patente, y 74 presentaciones. Terminó su doctorado en Microbiología Ambiental de la Universidad de Puerto Rico y realizó su tesis doctoral bajo la supervisión del doctor Terry Hazen en la planta de Savannah River en Carolina del Sur, en virtud de una beca predoctoral en Bioingeniería y Microbiología del Departamento de Energía de los Estados Unidos y de los Institutos Nacionales de Salud. Realizó estudios post-doctorales en Biotecnología Ambiental de la Universidad de Tennessee, en Knoxville, bajo la supervisión del Dr. Gary Saylor.

Mónica Lagomarsino: Es Licenciada en Ciencias Químicas con orientación Química Biológica y Licenciada en Análisis Biológicos (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA). Comenzó su actividad profesional en la industria farmacéutica en el Departamento de Control de Calidad de Farmasa Farmacéutica Argentina (Sterling Co., hoy Glaxo SmithKline). Actualmente es Jefa de Microbiología en GADOR SA. Ha participado en simposios y cursos y ha publicado trabajos en el país y un capítulo del libro “Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices” publicado en India por Horizons. En congresos de SAFyBI ha sido disertante en áreas de Microbiología y Garantía de Calidad, y coordinadora en el área de Microbiología. Fue miembro del comité organizador y disertante en el 1º y 2º Congreso Latinoamericano de Microbiología (CLAMME). Es miembro de la American Society for Microbiology (ASM), de la subcomisión de Microbiología de la Farmacopea Argentina, y de la Subcomisión de Buenas Prácticas de la división DAMyC de la Asociación Argentina de Microbiología.

Carlos Luis Llorens: Es arquitecto graduado en 1970 en la Facultad de Arquitectura y Urbanismo de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Es socio gerente de Biglieri – Llorens / Arquitectos S.R.L., de amplia trayectoria en el proyecto de obras industriales farmacéuticas, farmoquímicas y veterinarias. 74 obras con una superficie cubierta de 240.000 m², entre proyectadas, terminadas o en curso avalan una experiencia de más de 20 años de su Estudio profesional en el diseño y dirección de este tipo de obras. Ha dictado cursos, charlas, participado en seminarios, exposiciones en Argentina, Chile, Uruguay, Perú y Colombia; ha colaborado en libros y publicado artículos en *Pharmaceutical Technology* referidas a su especialidad. Es miembro de Comisión Directiva de ISPE Argentina. Participa activamente en ETIF como Consultor desde su inicio.

María Rosa Marello: Es Licenciada en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA, y Licenciada en Tecnología Industrial de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, UADE. Ha asistido a numerosos Cursos, Seminarios y Congresos organizados por SAFYBI, AAM, Biopore, BioMerieux. Trabajos presentados: “Actualización de un método de valoración de cianocobalamina y compuestos similares”, Congreso de Microbiología, AAM; “Efectividad de algunos agentes conservadores en emulsiones”– SAFYBI; “Comportamiento microbiológico de algunos sistemas de conservadores en emulsiones”, V Congreso Argentino de SAFYBI; “Control microbiológico de áreas productivas no estériles”- Revista SAFYBI, entre otros. Se ha desempeñado como Jefa de Microbiología en Laboratorios Mead Johnson y Laboratorios Casasco. Actualmente es asesora en empresas de la industria de medicamentos y cosméticos. Es Miembro de la Subcomisión de Bioseguridad y Biocustodia, AAM.

José E. Martínez: Es un consultor y gestor de proyectos para las compañías farmacéuticas, de biotecnología y de dispositivos médicos. Se especializa en la Transferencia de Tecnologías, Validación/ Calificación y Microbiología. Posee una licenciatura de ciencias (BS), "*Magna Cum Laude*", con concentración en Tecnología Médica y tiene una maestría en ciencias en dos especializaciones, Bioquímica y Microbiología. Ha publicado 11 artículos en revistas profesionales tales como "Pharmaceutical Technology" y "BioProcess International". Escribió un capítulo para el libro de texto y consulta titulado "*Advance Techniques in Instrument Qualification, Performance Verification and Analytical Method Validation*", 2010. Fue co-autor del estándar WK11898 de la "ASTM" "*Practice for Real-Time Release of Pharmaceutical Water for The Total Organic Carbon Attribute*", 2010. Ha sido orador principal de seminarios en América Central y del Sur, Puerto Rico y los E.U.A. Tiene 27 años de experiencia en los departamentos de validación, servicios técnicos, control de calidad y de microbiología.

Russ Nyberg: He is the Biological Technical Support for Raven Labs, Instructor for PDA Training Institute Faculty, and Instructor for ABSA. His present area of expertise is the use of Biological Indicators for sterilization processes in the Pharmaceutical Industry. On behalf of Raven Labs, Russ participates in numerous seminars and presentations. And he has had numerous articles on Sterilization Technology and Biological Indicators published in *Infection Control Today*, BioMed, Journal of Validation Technology, Managing Infection Control, AWWA Journal, Journal of Validation Technology, Pharmaceutical Technology, ICT, PMF NewsLetter and PDA Journal. He serves as Committee Member for Biological Indicators, Resistometer, Industrial Steam and Process Challenge Device Committees at AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation). Professional Organizations: ABSA (American Biological Safety Association), AWWA (American Water Works Association), PDA (Parenteral Drug Association), ASM (American Society of Microbiology), AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation), IFTPS (Institute for Thermal Processing Specialists)

Antonia Petracca: Lic. en Ciencias Biológicas (UBA). Actualmente Inspector Fase III – MERCOSUR – Inspector PIC/S, en el Instituto Nacional de Medicamentos. Ex-responsable del Sector de Esterilidad del Servicio de Bioseguridad del Dto. de Microbiología e Inmunología. Ex-docente en la Cátedra de Ecología General del Depto. de Biología en la Fac. Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Ex-docente del curso de posgrado "Control Microbiológico de Medicamentos" de la Univ. Católica de Córdoba. Docente de los Cursos de Capacitación para Inspectores en la Fase I y Fase II- MERCOSUR y Curso a Distancia de BPFyC. Entrenamiento a inspectores, becarios, residentes y pasantes del INAME. Disertante en congresos y cursos en la especialidad. Secretaria de Actas de Terceras Jornadas Rioplatenses de Microbiología, organizadas por la AAM y la SUM. Integrante del Sub-comité de "Agua y SPGV" de la Farmacopea Argentina. Miembro titular de la AAM. Ex-Presidente de la Asociación de Profesionales del INAME. Ex-miembro de la Regulatory Affairs Professionals Society, con sede en Rockville-MD-USA y de la Comisión Permanente de la Carrera Profesional- ANMAT. Docente en Escuela de Educación Técnica E.T.N° 33.

Silvia Elena Rastelli: Lic. en Biología (orient. Ecología), Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCN y M) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Inscripta en la carrera del doctorado de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP con el tema de tesis: "*Efecto de biopelículas bacterianas sobre materiales de redes de distribución de agua potable e interacción con metales tóxicos*". Beca de inicio: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (2007-2010). Beca Interna Tipo II CONICET (2011-2013). Ha asistido y/o aprobado 3 cursos de grado (1997-2001) y 14 de posgrado (2005-2011). Ha participado en 26 reuniones científicas nacionales, regionales e internacionales (1998-2011), en 12 de ellas presentó trabajos en forma oral o de póster cuyos resúmenes o trabajos completos fueron publicados en las actas de dichos congresos o reuniones. Docencia en nivel medio y pre-universitario en el área de Ciencias Naturales y Biología (2004-2010), y en nivel universitario como Ayudante Diplomado, D.S. en la Cátedra de Botánica Sistemática II, Plantas vasculares. FCN y M (2007 a la actualidad).

Blanca Margarita Rosales: Dra. en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires (UBA)(1968). Jefa Departamento de Investigaciones en Corrosión, CITEFA (1972-2002). Investigadora independiente del CONICET en CIDEPIINT (2003- 2008). Especialista en: Corrosión Atmosférica, Corrosión Microbiológica, Inhibidores de Corrosión, Conservación de Patrimonio Cultural, Red de Distribución de Agua Potable de Ciudad de Bs. As., Corrosión en Industrias (Aeronáutica, Automotriz, Ferroviaria, Gas y Petróleo, Hidráulica, Militar, Minera, Metalúrgica, Naval, Peritajes Técnicos, Química, Recubrimientos Orgánicos e Inorgánicos, Siderúrgica, Telecomunicaciones) (1976-2010).
Proyectos internacionales: 3 sobre Corrosión Atmosférica: "ISOCORRAG", (ISO, 1988-98) - "MICAT", (CYTED,

1988-95) - "PATINA", (CYTED, 1996-2001). - "Aircraft Integral Fuel Tank Corrosion Study", EOARD (European Office of Aerospace Research and Development, USA Air Force 2001-2003), Representante Científica por Argentina en el Bulletin of the Research On METal Conservation (BROMECA) y en Centro Internacional de Museos, (2003-2005).

Sergio Adrián Teves: Es Bioquímico, especialista en Producción de Cosméticos (UBA). Profesor adjunto de Microbiología, a cargo de Microbiología de Alimentos, Director del curso, "*Control Microbiológico de Fármacos no Estériles, Cosméticos, Biomédicos y áreas relacionadas. Interpretación según Farmacopeas*" (FFyB. UBA). Vice-director y Coordinador de la Carrera de Especialización en producción de cosméticos (FFyB. UBA). Autor de 20 trabajos en revistas con referato, autor de 5 trabajos en revistas sin referato, Coautor de 3 capítulos de libro y autor de más de 40 trabajos presentados en congresos y reuniones científicas. Miembro del comité Asesor Específico para carreras de Especialización en el Área de Farmacia (FFyB UBA). Miembro de la subcomisión de Microbiología de la Farmacopea Nacional Argentina. Subjefe del laboratorio de Microbiología de Proanálisis S.A.

Graciela Torno: Licenciada en Ciencias Químicas con orientación Química Biológica, egresada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Comenzó su actividad profesional en la industria farmacéutica en el departamento de Control de Calidad de Laboratorios Roche S.A. A partir de 1986 se desempeña como responsable del Laboratorio de Microbiología en Roche S.A. hasta el año 2005 que pasa a trabajar en Bayer S.A. en la misma posición. Tarea que desempeña hasta la actualidad. Ha participado como Secretaria Técnica en los Congresos organizados por la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), CLAMME I y II. Es miembro de la Subcomisión de Microbiología de la Farmacopea Argentina; y de la Subcomisión de Buenas Prácticas de la división DAMyC de la Asociación Argentina de Microbiología.

Alejandra Vázquez: Profesional del Área de Calidad con más de 25 años de experiencia en Control y Aseguramiento de la Calidad y Entrenamiento en Buenas Prácticas de Manufactura en empresas multinacionales de primera línea. *Certified Quality Engineer en la American Society for Quality*. Tiene postgrados en Gerenciamiento de la Calidad en ITBA-IPACE y en Dirección empresarial en IAE Universidad Austral. Facilitador para el proceso de Mejora Continua-UTN. Consultor en Calidad en empresas farmacéuticas, cosméticas, alimenticias y de la salud en Áreas de Calidad. Jurado de la Competencia Nacional de Equipos Estrellas de la Excelencia en 2011/12. IPACE-ASQ. Auditor del Programa de Auditorías de proveedores de la industria farmacéutica IPAC-. FUNDECE. Miembro de la Subcomisión de Microbiología de la Farmacopea Argentina. Miembro de la subcomisión de Buenas Prácticas/ DAMYC en la AAM. Fue responsable Regional de Calidad LATAM (Brasil, México, Chile, Colombia y Argentina) de los Laboratorios de Microbiología en Wyeth/ Pfizer donde trabajó 17 años. Fue profesional del área de la calidad en la certificadora internacional SGS durante 8 años. Fue becaria en el Departamento de Biología del INAME.

Esteban Zarankin: Licenciado en Ciencias Biológicas (CAECE). Especialista en Calidad Industrial (UNSAM). Quality Manager (*Deutsche Gesellschaft für Qualität e. V.*). Se ha desempeñado como Ayudante de primera en la cátedra de Introducción a la Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de CAECE. Comenzó su actividad profesional en la industria cosmética en el Laboratorio de Microbiología de Industrias Químicas Independencia (IQUISA) donde actualmente se desempeña como Jefe de Calidad. Es miembro de la Subcomisión de Buenas Prácticas de la división DAMyC de la Asociación Argentina de Microbiología. Fue miembro del Comité Organizador del 1° y 2° Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos (CLAMME).

Alba Zaresky: Agradecemos su participación como revisora del capítulo *Incertidumbre en la medición asociada con resultados microbiológicos*.

CONTENIDO DEL MANUAL

Sección I. Generalidades.

Capítulo I.1.	Crecimiento Microbiano Mirta Franco	2
Capítulo I.2.	Fuentes de Contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos María Cristina Fernández	16
Capítulo I.3.	Medios de cultivo Héctor Cerra	23
Capítulo I.4.	Equipamiento: Calificación y Control Graciela Torno	33

Sección II. Preservación, Desinfección y Esterilización.

Capítulo II.1.	Desinfectantes y Desinfección de superficies y equipos Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves	40
Capítulo II.2.	Esterilización Celina Horak y Nora Carbone	53
II.2.A.	Esterilización por Calor húmedo Federico Kurt Lungwitz y Nora Carbone	59
II.2.B.	Esterilización con Radiaciones ionizantes Celina Horak	81
II.2.C.	Esterilización por Óxido de etileno Nora Carbone	97
II.2.D.	Filtración esterilizante de fluidos Mino Covo	112
Capítulo II.3.	Indicadores biológicos de esterilización Russ Nyberg	130
Capítulo II.4.	Control de la Validación de un Proceso de Saneamiento José E. Martínez	141
Capítulo II.5.	Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves	152

Sección III. Instalaciones y su influencia en la calidad microbiológica de los productos.

Capítulo III.1.	Diseño del Laboratorio de Microbiología Carlos Luis Llorens	166
Capítulo III.2.	Filtros HEPA, flujo laminar y cabinas de bioseguridad Mino Covo	178
Capítulo III.3.	Aguas para Aplicaciones Farmacéuticas Carlos Chiesa	210
Capítulo III.4.	Biopelículas Blanca M. Rosales y Silvia E. Rastelli	226
Capítulo III.5.	Simulación del proceso de llenado aséptico o Media fill Néstor Oscar Aversa	238

Sección IV. Métodos de control.

Capítulo IV.1.	Ensayo de Esterilidad Antonia Petracca y Alejandra Vázquez	249
Capítulo IV.2.	Endotoxinas bacterianas Beatriz Giampaolo y Nélida Mondelo	276
Capítulo IV.3.	Control microbiológico de Medicamentos no obligatoriamente estériles María Cristina Fernández	305
Capítulo IV.4.	Verificación de la Aptitud de métodos microbiológicos Sergio Iglesias	325
Capítulo IV.5.	Valoraciones de Antibióticos por métodos microbiológicos Mirta Franco	343
Capítulo IV.6.	Valoración microbiológica de Vitaminas Graciela Torno	364
Capítulo IV.7.	Control microbiológico de Cosméticos Esteban Zarankin	372
Capítulo IV.8.	Control microbiológico de Aguas Sergio Iglesias y Mónica Lagomarsino	379
Capítulo IV.9.	El complejo <i>Burkholderia cepacia</i> José Degrossi	388

Capítulo IV.10.	Monitoreo ambiental Alejandra Vázquez y Claudio Denoya	401

Capítulo IV.11.	Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos Luis Jiménez	428

Sección V. Aseguramiento de la calidad y Seguridad en el laboratorio de Microbiología

Capítulo V.1.	Investigación de las Desviaciones de los Resultados Microbiológicos Mónica Lagomarsino	449
Capítulo V.2.	Evaluación del Riesgo de Contaminación Microbiológica Mónica Lagomarsino	461
Capítulo V.3.	Documentación y Registro Patricia Domínguez	470
Capítulo V.4.	Incertidumbre de medición asociada a los resultados de ensayos microbiológicos Susana Carnevali	476
Capítulo V.5.	Capacitación y Entrenamiento Patricia Domínguez	495
Capítulo V.6.	Auditoría del Laboratorio de Microbiología Néstor Oscar Aversa	502
Capítulo V.7.	Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología María Rosa Marelló	514

PREFACIO

El “*Manual de Microbiología aplicada a las industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*”, es un libro actualizado, único por estar en español, y que cubre una gran variedad de temas que son de consulta permanente por los microbiólogos y otras áreas relacionadas con la calidad. Además ha sido pensado para que pueda formar parte de la bibliografía en las materias afines de carreras universitarias y terciarias.

Este libro ha nacido como una inquietud de los miembros de la Subcomisión de Buenas Prácticas, dependiente de la División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC), perteneciente a la Asociación Argentina de Microbiología (AAM), debido a la cantidad de consultas que con frecuencia recibimos, por la falta de textos que abarquen todos los temas aquí tratados, pero sobre todo por la ausencia total de bibliografía en nuestra lengua.

Es un texto sin precedentes para profesionales, estudiantes y docentes de la Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética, de productos médicos y otras relacionadas, en la que no sólo se tratan temas teóricos, prácticos y además relacionados con las buenas prácticas, sino que además incluye nuevas tecnologías, algunas ya en uso incipiente, y otras que están en desarrollo, pero que pueden ser aplicadas en el futuro.

El manual está separado en cinco secciones, que incluyen capítulos de tópicos específicos, cada uno de los cuales ha sido redactado por personas calificadas y reconocidas en el tema. Cada autor ha tenido libertad para reflejar su propia experiencia y su propio estilo, pero manteniendo un nivel adecuado, tanto para que sea útil y práctico como libro de consulta, como para que contenga toda la información teórica necesaria para el lector.

La *Sección I* del manual es una introducción que incluye “Generalidades” o tópicos apropiados y necesarios de la Microbiología, que son básicos para la comprensión posterior de algunos temas tratados más adelante.

La *Sección II*, trata extensamente de temas básicos también relacionados con prácticamente todos los ámbitos de la Microbiología como es la destrucción microbiana en todas sus formas. En este capítulo hemos tenido la ayuda de expertos extranjeros, como los Dres. José E. Martínez, Luis Jiménez y Russ Nyberg, que generosamente han contribuido con su conocimiento, y a quienes agradecemos la confianza.

En la *Sección III* se agrupan los capítulos relacionados con las instalaciones, desde su diseño, hasta la calidad de los servicios, como el aire y al agua, temas tan importantes e influyentes en la calidad microbiológica de los productos farmacéuticos y cosméticos, así como lo son en otras industrias y laboratorios, que de una u otra manera están dedicados a la salud o a la elaboración de productos para consumo humano. También en esta sección se incluyó el tema de la simulación del llenado aséptico (Media Fill), aplicado exclusivamente a la validación del llenado de productos estériles, tan dependiente de la calidad del aire, entre otros.

Los capítulos de la *Sección IV* tratan de los métodos microbiológicos y sus validaciones. En esta sección se incluyen dos capítulos con la descripción de nuevas tecnologías, para los que se invitó a participar a dos expertos en estos temas radicados en el exterior, los Dres. Claudio Denoya y Luis Jiménez, a quienes agradecemos su generoso aporte.

Y por último, en la *Sección V*, los capítulos tratan de los aspectos relacionados al aseguramiento o garantía de la calidad, y a temas de seguridad relacionados al laboratorio de Microbiología.

Los editores de este libro, miembros de la Subcomisión de Buenas Prácticas de la AAM, agradecemos a todos los autores que con tanto profesionalismo y generosidad nos han brindado sus conocimientos y experiencia.

Héctor Cerra

María Cristina Fernández

Celina Horak

Mónica Lagomarsino

Graciela Torno

Esteban Zaranquin

Sección I. Generalidades.

	página
Capítulo I.1. Crecimiento Microbiano Mirta Franco	2
Capítulo I.2. Fuentes de Contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos María Cristina Fernández	16
Capítulo I.3. Medios de cultivo Héctor Cerra	23
Capítulo I.4. Equipamiento: Calificación y Control Graciela Torno	33

Crecimiento Microbiano

Mirta Franco

- *Introducción*
- *Visualización del crecimiento*
- *Medición del crecimiento*
 1. *Recuento de microorganismos viables*
 - *Recuento en placa*
 - *Número más probable*
 2. *Determinación de microorganismos totales*
 - *Recuento directo*
 - *Medición de la masa celular*
 - *Determinación de peso de la fracción celular*
 - *Determinación de la Absorbancia*
- *Curva de crecimiento*
- *Factores que modifican el crecimiento microbiano*
- *Cultivo continuo*
- *Cultivo sincronizado*
- *Bibliografía*

Introducción

El crecimiento microbiano puede definirse como el aumento de los constituyentes celulares. En los microorganismos que se multiplican por fisión binaria o gemación, el crecimiento produce un aumento del número de células. En los microorganismos cenocíticos, el crecimiento produce aumento del tamaño pero no del número de células.

En bacterias, la síntesis regulada de todos los constituyentes de una célula bacteriana produce primero un aumento de su masa y luego, cuando ésta ha sido duplicada, la división de la bacteria por el mecanismo de fisión binaria. De esta manera se originan dos bacterias hijas de las que puede decirse que, en términos generales, son iguales entre sí e iguales a la bacteria parental que les dio origen. A continuación cada una de las bacterias hijas repetirá el ciclo de la bacteria parental y se originarán 4 bacterias, aumentando el número de ellas, es decir de la población bacteriana, en progresión geométrica (Figura 1).

Visualización del crecimiento

En medios líquidos el aumento del número de bacterias se visualiza como turbidez y/o formación de sedimento o película en los cultivos. En cambio, en medios agarizados el aumento del número de bacterias produce colonias macroscópicamente visibles, algunas de cuyas características (tamaño, forma, color, etc.) pueden contribuir a la identificación del microorganismo.

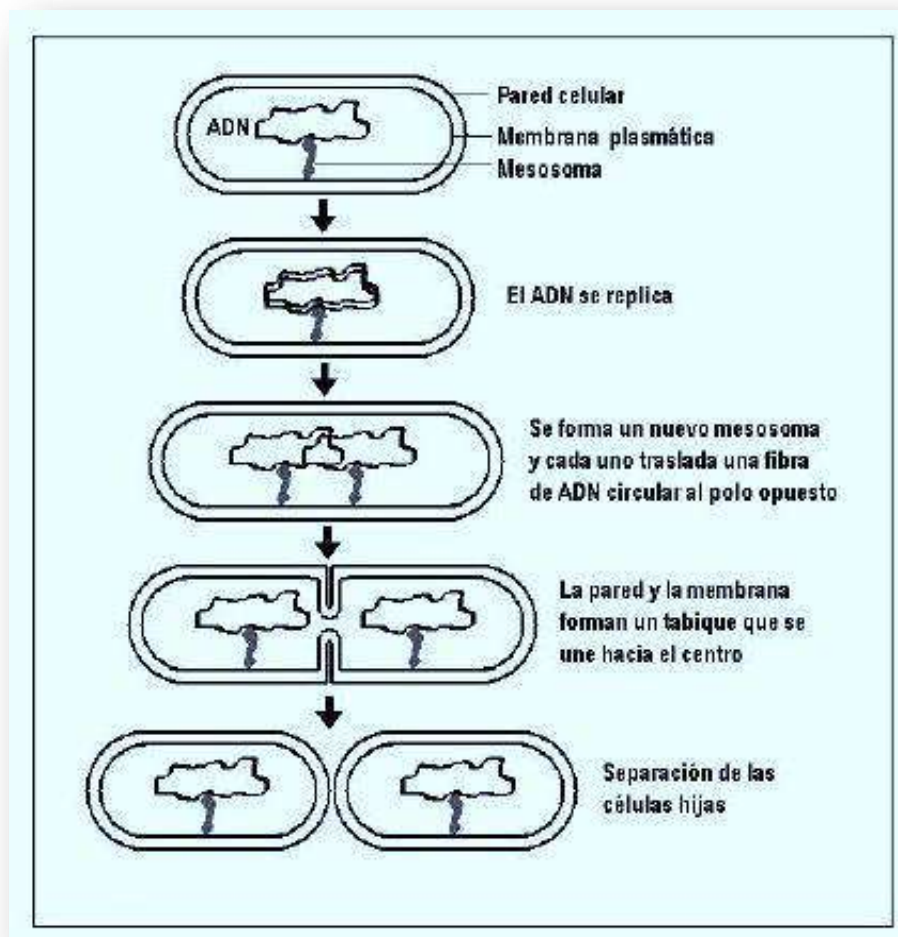
Medición del crecimiento

Para medir el crecimiento se pueden emplear técnicas que estimen el número de bacterias, ya sea totales o

viables, o la masa celular. A continuación se describen algunos de los métodos más usados.

De acuerdo a la técnica empleada para el recuento, su resultado expresará el número de microorganismos totales (viables más no viables) o solamente viables presentes en una muestra, siendo éstos últimos los que poseen la capacidad de crecer y multiplicarse.

Figura 1: Fisión binaria en bacterias



Recuento de microorganismos viables

Recuento en placa

El recuento de microorganismos viables en placa se basa en la formación de una colonia a partir de cada célula viable, utilizando como soporte, medios agarizados en placas de Petri. No puede asegurarse indubitavelmente que toda colonia derive de un solo microorganismo, por eso la forma correcta de expresar los resultados es como unidades formadoras de colonias (UFC).

El recuento se puede realizar por “*plaqueo*” en medios agarizados o por *retención en una membrana filtrante*. Las técnicas de recuento de viables en placas son sensibles, relativamente sencillas y se usan ampliamente para el recuento de bacterias y otros microorganismos en muestras de alimentos, medicamentos, agua, etc.

La forma corriente de realizar un recuento de unidades formadoras de colonias es la siguiente: realizar diluciones seriadas 1/10 de una suspensión bacteriana o de una muestra en ensayo y sembrar volúmenes medidos de varias de ellas, de modo de obtener colonias separadas. Esto se logra cuando el número de colonias por placa de Petri es entre 30 y 300, dependiendo del tamaño de las colonias originadas. En

general, por encima de ese límite hay superposición de colonias y por debajo de él la significación estadística es muy pobre.

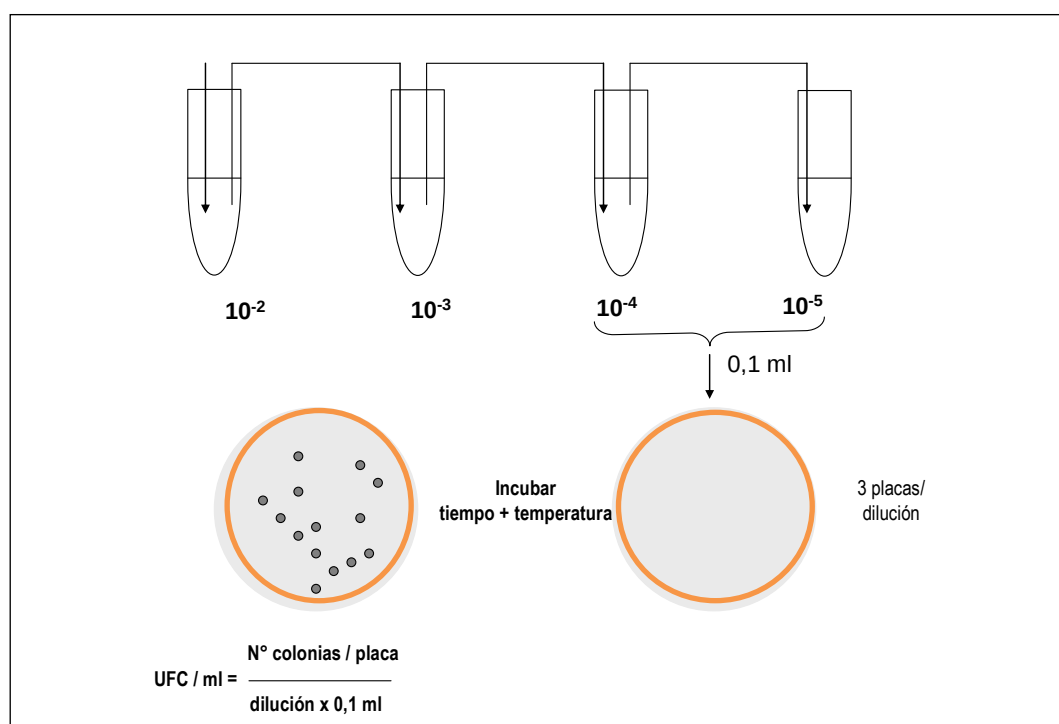
Las siembras se pueden hacer:

- por diseminación: sobre la superficie del medio ya gelificado y seco, contenido en la placa, de volúmenes de 0,1 – 0,2 ml de las diluciones correspondientes, o
- en profundidad: incorporando el inóculo en un volumen de medio fundido, mantenido a temperaturas compatibles con la viabilidad microbiana (aproximadamente 45° C), que luego se vuelca en una placa de Petri y se deja gelificar. Los volúmenes inoculados pueden ser de hasta el 10% del volumen del medio.

Luego de la incubación en las condiciones apropiadas para cada microorganismo, la concentración de UFCs presentes en una suspensión se calcula multiplicando el número de colonias por placa, promedio de varias placas, por la inversa de la dilución de la suspensión, y dividiendo por el volumen sembrado:

$$UFC / ml = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placa}}{\text{Volumen sembrado} \times \text{dilución}}$$

Figura 2: Recuento en placa por diseminación en superficie



En la Figura 2 se esquematiza el procedimiento para contar las UFC/ml en una suspensión bacteriana, utilizando la técnica de siembra por diseminación en superficie. Si, por ejemplo, un volumen de 0,1 ml de la dilución 1×10^{-4} de un cultivo origina un promedio de 120 colonias por placa, el número de UFC por mililitro de cultivo será de $1,2 \times 10^7$ ($120 \text{ UFC} / 10^{-4} \times 0,1 \text{ ml}$).

Cuando el número de microorganismos viables presentes en una muestra es bajo, se puede recurrir a la filtración de la misma a través de filtros de membrana que retienen bacterias. Luego de filtrar la suspensión que contiene las bacterias a cuantificar, la membrana se coloca sobre la superficie de un medio agarizado o sobre una fina almohadilla de papel absorbente (*pad*) embebido con medio líquido, se incuba en condiciones adecuadas y se cuentan las colonias, que representan el número de UFC presentes en el volumen de muestra filtrado.

Tanto para la técnica de “plaqueo” directo como para la de filtración se pueden utilizar medios especiales, selectivos y/o diferenciales, que permiten el recuento de bacterias específicas.

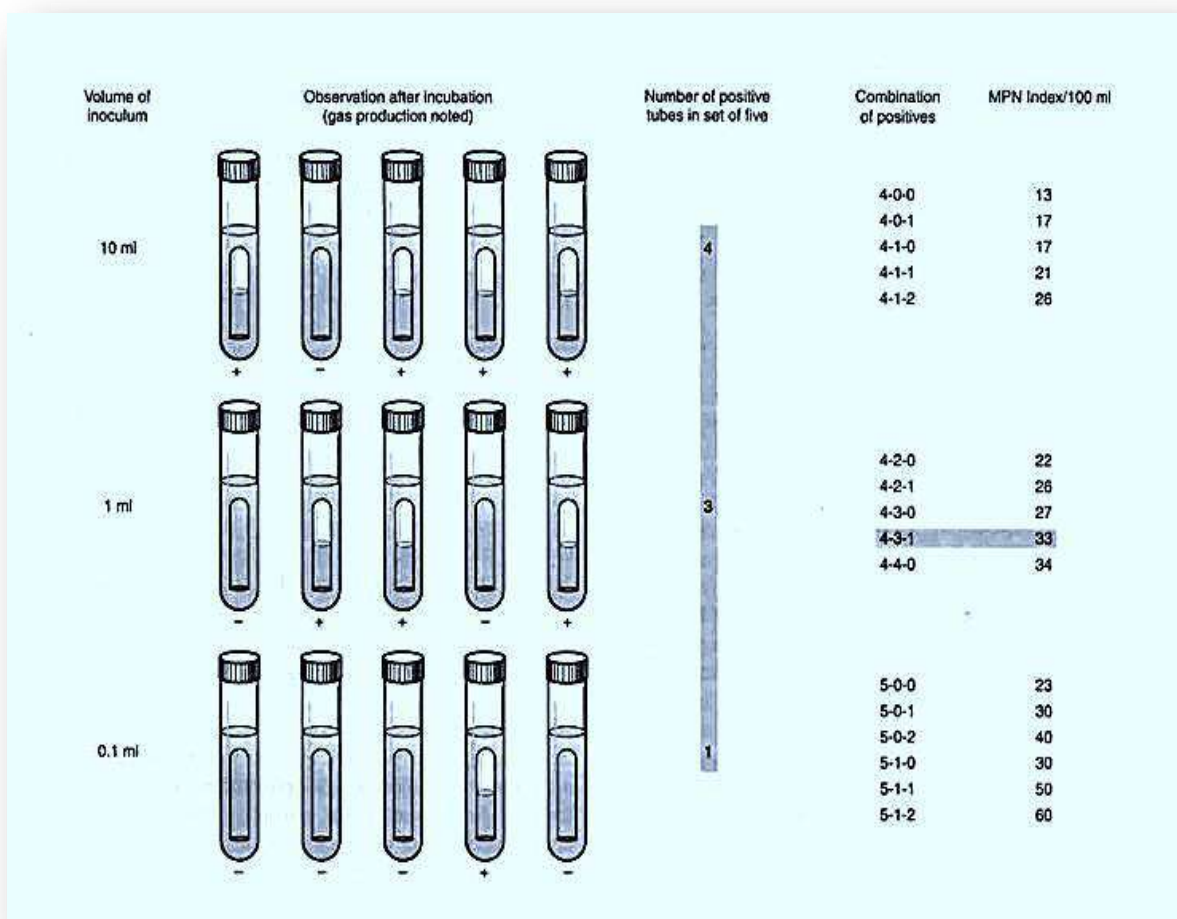
Número más probable

La concentración de microorganismos viables puede ser estimada por el método del número más probable (NMP). Este método infiere matemáticamente el recuento de viables a partir de la fracción de cultivos en tubos que no muestran crecimiento.

Consiste en realizar varias diluciones de la muestra, inocular varias réplicas de las mismas en tubos conteniendo un medio de cultivo apropiado y registrar el número de tubos con crecimiento en cada dilución.

Es un método estadísticamente ineficiente, por lo que es necesario sembrar varios tubos con cada dilución. Sin embargo, resulta útil para el recuento de microorganismos en suspensiones con baja concentración o que producen algún producto detectable en el medio, que permita diferenciarlo de otros microorganismos presentes en la muestra., por ejemplo para el recuento de coliformes en aguas. En la Figura 3 se muestra un ejemplo utilizando una tabla con tres niveles de diluciones y 5 tubos por dilución

Figura 3. Recuento de viables por el método del NMP



Determinación de microorganismos totales

Se emplean métodos que determinan directamente el número de bacterias suspendidas en un medio líquido o el peso correspondiente a la fracción celular. También se pueden utilizar métodos indirectos, entre ellos el más utilizado es la determinación de la absorbancia de las suspensiones celulares, que, dentro de cierto margen y en condiciones estandarizadas, es proporcional a la masa celular.

Recuento directo

El recuento en cámara por microscopía óptica es un método útil para determinar el número de bacterias totales en una suspensión, cuando su concentración no es demasiado baja. Brinda también información sobre el tamaño y la morfología de los microorganismos.

Las suspensiones se colocan en cámaras de recuento de volumen conocido. En el caso del recuento de bacterias estas cámaras poseen un espesor sensiblemente menor que los hemocitómetros, debido al menor tamaño de las bacterias. Las cámaras de recuento de Petroff-Hausser tienen un espesor de 0,02 mm, que las hace particularmente aptas para el recuento de bacterias. La superficie de la cámara es de 1 mm² y está dividida en 25 cuadrados. Luego, el número de bacterias por mm³ se calcula multiplicando el número de bacterias en un cuadrado por el número de cuadrados (25) y por la inversa del espesor ($1 / 0.02 = 50$). Esta técnica requiere un alto nivel de control de calidad operativa y aun así tiene un amplio margen de variación.

Los protozoos, algas y levaduras, que son de mayor tamaño que las bacterias, pueden contarse con contadores electrónicos (Coulter). Este método consiste en hacer pasar una suspensión de microorganismos a través de un pequeño orificio. A través del mismo fluye una corriente eléctrica y los electrodos situados a ambos lados miden su resistencia eléctrica. Cada vez que una célula microbiana atraviesa el orificio, aumenta la resistencia eléctrica y se cuenta la célula.

Medición de la masa celular

El aumento del número de microorganismos va acompañado de un aumento continuo de la masa celular en el cultivo que, por supuesto, refleja el total de las células (viables más no viables). La masa celular en un cultivo microbiano puede medirse directamente determinando el *peso de la fracción celular* o indirectamente midiendo la absorbancia de las suspensiones microbianas.

Determinación del peso de la fracción celular

Se puede determinar el peso seco o húmedo de la fracción celular de una alícuota de una suspensión. Como el contenido de humedad de la fracción húmeda puede ser variable, resulta más reproducible la determinación del peso seco. Para ello las alícuotas a analizar se colocan en pesafiltros previamente tarados, se evapora a sequedad en estufas y se determina su nuevo peso. La diferencia con la tara corresponde al peso celular en la alícuota. En ciertos casos es necesario lavar la fracción celular de las alícuotas por sucesivas centrifugaciones y resuspensiones en soluciones acuosas adecuadas. Esta técnica tiene la desventaja de que es poco sensible, se requiere grandes cantidades de microorganismos y suficiente cantidad de muestras para cumplir exigencias estadísticas de reproducibilidad, que la transforman en una técnica larga y engorrosa. Se la usa principalmente para medir la masa de cultivos de hongos filamentosos.

Manteniendo el mismo principio de la obtención de células por centrifugación de un volumen determinado de la suspensión bacteriana, se puede estimar la masa celular midiendo, en el sedimento final, el contenido de diferentes elementos (nitrógeno, carbono) y/o moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, etc.

Determinación de la absorbancia

Una técnica más rápida, más sensible y de uso corriente se basa en medir espectrofotométricamente la *dispersión de la luz* producida por las bacterias presentes en una suspensión. A medida que aumenta la concentración de bacterias el cultivo se vuelve más turbio (aumenta la absorbancia) y la luz transmitida es menor. Debido a que las células de una especie bacteriana tienen tamaños relativamente constantes, la dispersión de la luz puede considerarse proporcional a la concentración de bacterias en la suspensión. La relación lineal entre absorbancia y concentración celular sólo se cumple en un rango determinado de concentraciones y, además, la absorbancia de una suspensión bacteriana no depende sólo de la masa celular sino también de otros factores, como por ejemplo la forma de las bacterias. Por ello es aconsejable realizar una curva de calibración para cada sistema, de modo de establecer la relación entre la densidad óptica (DO) y el parámetro estimado, efectuando distintas diluciones de una suspensión concentrada y midiendo sus respectivas absorbancias.

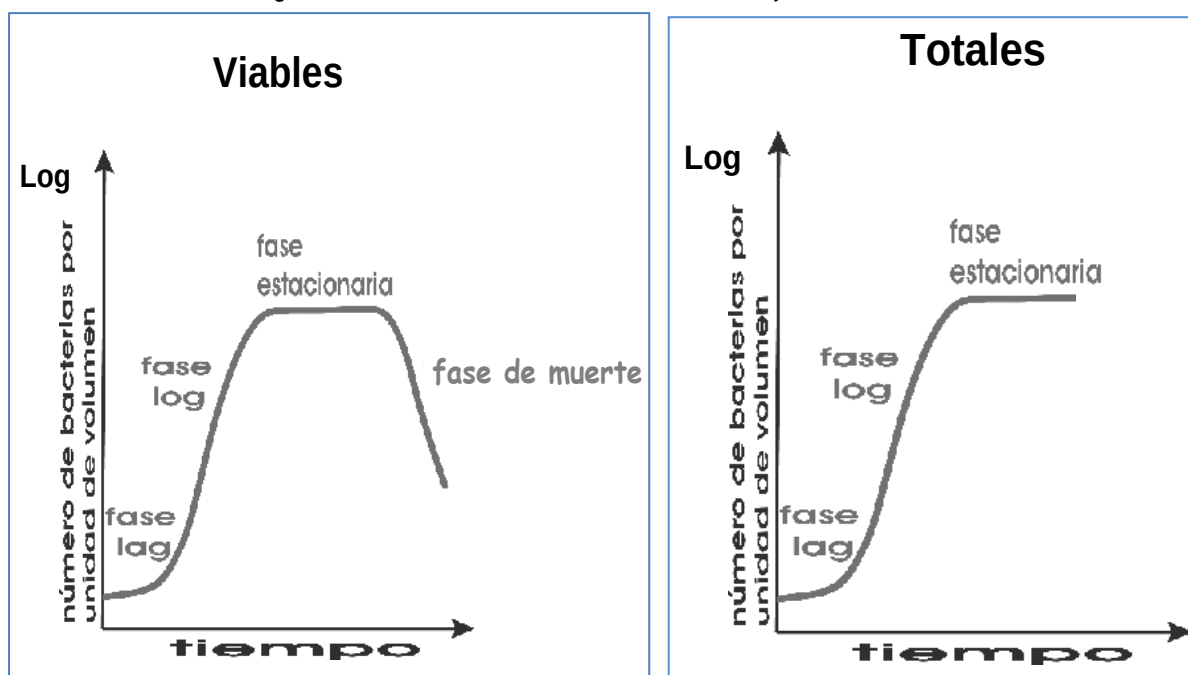
Esta técnica es de gran aplicación en los ensayos microbiológicos de factores de crecimiento y antibióticos en medios líquidos. También se aplica esta técnica para estandarizar suspensiones inóculo, aunque en la práctica diaria de laboratorio se utilizan comparadores de turbidez (escala de *Mc Farland*) con los cuales se efectúan cálculos de concentración de bacterias.

Curva de crecimiento

De acuerdo a lo dicho anteriormente, cuando una célula bacteriana se encuentra en un medio ambiente en el que puede sintetizar en forma regulada todos sus constituyentes, se observa primero un crecimiento individual, es decir un aumento de su masa y de su volumen, y luego un crecimiento de la población debido a sucesivas divisiones celulares. La masa aumenta continuamente, mientras que el número de bacterias se duplica a intervalos de tiempo regulares.

Cuando un número N_0 de bacterias, cuyos ciclos celulares no están sincronizados, se inoculan en un medio de cultivo líquido que les provee todos los nutrientes necesarios y se incuban en condiciones adecuadas a sus requerimientos, se produce el aumento de la población bacteriana. En la Figura 4 se muestran los gráficos del logaritmo del número de bacterias viables y totales presentes en un cultivo cerrado versus el tiempo de incubación. En las curvas de crecimiento se observan las siguientes fases: adaptación, crecimiento exponencial, estacionaria máxima y muerte (sólo en la curva de viables).

Figura 4. Curvas de crecimiento de bacterias viables y de bacterias totales



Fase de adaptación o fase lag o fase de retardo

Durante esta etapa el metabolismo de las bacterias inoculadas se adapta a las nuevas condiciones de cultivo. Si bien las bacterias son activas metabólicamente, no se observa aumento del número. Su duración es variable, puede ser muy corta o estar ausente cuando las bacterias están capacitadas para utilizar inmediatamente los nutrientes (por ejemplo cuando provienen de un cultivo en fase exponencial en el mismo medio de cultivo) o relativamente larga cuando: a) están injuriadas, b) son viejas y, por lo tanto, deficientes en ATP, cofactores esenciales y ribosomas, y c) la composición del medio es diferente a la de aquel del que provienen y hace necesaria la inducción de algunas enzimas para poder utilizar algún nutriente esencial.

También influyen sobre su duración algunos factores físicos que modifican la velocidad de reacciones enzimáticas, como la temperatura, pH y la fase gaseosa.

Fase de crecimiento exponencial o logarítmico

Durante esta etapa cada bacteria es capaz de duplicar su masa y dividirse a intervalos regulares, dando lugar al crecimiento exponencial de la población. Aunque la división celular ocurre a intervalos regulares, la falta de sincronización entre los ciclos individuales de cada célula hace que tanto el aumento de la masa como el del número de bacterias se observen como una función continua. La fase de crecimiento exponencial representa la etapa en la que la velocidad de crecimiento es constante y máxima para esas condiciones de cultivo. La velocidad de crecimiento puede ser modificada cambiando la composición del medio de cultivo y/o las condiciones de incubación.

El período de tiempo entre dos divisiones sucesivas se denomina tiempo de generación (g) y es una estimación de la velocidad de crecimiento. Cuando g = 30 minutos, la población se duplica cada 30 minutos, es decir 2 veces por hora. Cuando g es menor, por ejemplo 20 minutos, se producen 3 divisiones por hora, es decir la velocidad de crecimiento es mayor. Luego, la relación entre g y velocidad de crecimiento es inversa, a mayor g menor velocidad de crecimiento y viceversa.

La expresión matemática del crecimiento exponencial es:

$$N_t = N_0 \times 2^n$$

donde: N_t = número de bacterias al tiempo t
 N_0 = número inicial de bacterias (tiempo 0)
 n = número de generaciones

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$

La velocidad de crecimiento se puede expresar también como la constante de velocidad de crecimiento (k), que representa el número de generaciones por unidad de tiempo.

$$k = n / t \quad \text{cuando } n = 1, t = g, \quad \text{Luego } k = 1 / g$$

Fase estacionaria máxima

El crecimiento bacteriano en un cultivo cerrado, en el que no hay aporte de nuevos nutrientes ni remoción de los productos del metabolismo, es autolimitado. Luego de varias generaciones, diversos factores, entre ellos la disminución o agotamiento de los nutrientes disponibles, la acumulación de productos metabólicos tóxicos y la disminución del espacio vital, hacen que la multiplicación bacteriana cese o que su velocidad de crecimiento disminuya a niveles que se equilibran con la velocidad de muerte.

La concentración de células en esta fase se denomina cosecha máxima, y depende del tipo de microorganismo, de la composición del medio y de las condiciones de incubación.

Fase de muerte

Desde un punto de vista biológico la muerte celular representa la pérdida de su capacidad de multiplicación, aunque no significa necesariamente pérdida absoluta e inmediata de todas las funciones celulares. El único criterio válido de muerte bacteriana es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse en cualquier medio adecuado para ello. Queda así definido un concepto fundamental, la *viabilidad*, que permite diferenciar en una población dos clases de bacterias:

- a) las bacterias viables (o vivas) que son aquellas que conservan su capacidad reproductora, y
- b) las bacterias no viables (o muertas) que son las que han perdido esa capacidad.

Por lo tanto, la observación de la fase de muerte sólo es posible cuando se analiza la evolución del número de bacterias viables presentes en la población.

La muerte bacteriana responde a una cinética exponencial, es decir que en períodos de tiempo iguales se

mueren porcentajes constantes de la población.

En algunos casos la muerte bacteriana va acompañada de lisis celular, observándose no sólo disminución del número de bacterias viables sino también de la masa celular.

La muerte de las bacterias puede provocarse por el uso de agentes antimicrobianos con actividad bactericida. Este tema se desarrolla en la Sección II del presente manual.

Factores que modifican el crecimiento bacteriano

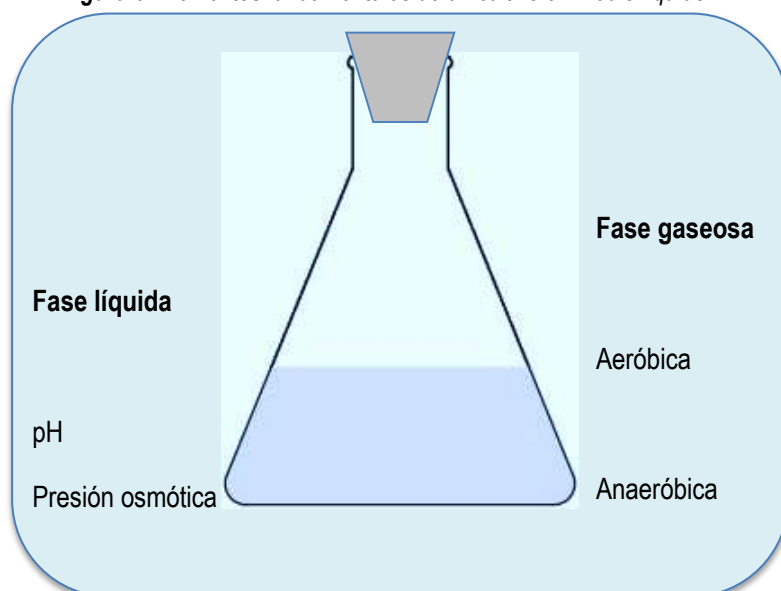
De acuerdo a lo que hemos visto, la multiplicación bacteriana requiere el aporte de sustancias químicas (nutrientes) y condiciones físicas y químicas adecuadas. El conocimiento de los factores que modifican el crecimiento bacteriano nos permitirá:

- 1) Establecer condiciones de laboratorio en las cuales una o más especies bacterianas puedan desarrollar satisfactoriamente, de modo de poder evidenciar y cuantificar su presencia en cualquier muestra.
- 2) Controlar la proliferación bacteriana impidiendo o desfavoreciendo su multiplicación.

Del mismo modo las propiedades físicas y químicas de productos tales como alimentos, medicamentos, etc., orientan sobre la calidad de los microorganismos eventualmente presentes.

Veremos a continuación cuáles son los principales factores que inciden sobre el crecimiento bacteriano.

Figura 5. Elementos fundamentales de un cultivo en medio líquido



Nutrientes y factores de crecimiento

Entre los principales factores que influyen sobre la velocidad de crecimiento debe considerarse la calidad y cantidad de los nutrientes disueltos en el medio de cultivo.

Cualitativamente estos nutrientes deben proveer todos los elementos químicos que necesitan las bacterias (carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, azufre, iones inorgánicos, etc.) para biosintetizar sus componentes, y la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones. De acuerdo a las capacidades metabólicas de las bacterias, diferentes formas químicas de un mismo elemento pueden determinar velocidades de crecimiento diferentes.

Por otra parte, la concentración de cada uno de esos compuestos químicos influye sobre la velocidad de crecimiento. En general puede definirse una concentración óptima para cada nutriente, que es aquella que produce la mayor velocidad de crecimiento en determinadas condiciones. Concentraciones inferiores a la óptima se denominan concentraciones limitantes. En el rango de las concentraciones limitantes, un aumento de la concentración del nutriente se traduce en un aumento de la velocidad de crecimiento. Por encima de la concentración óptima pueden darse dos efectos; que el aumento de la concentración del nutriente no modifique

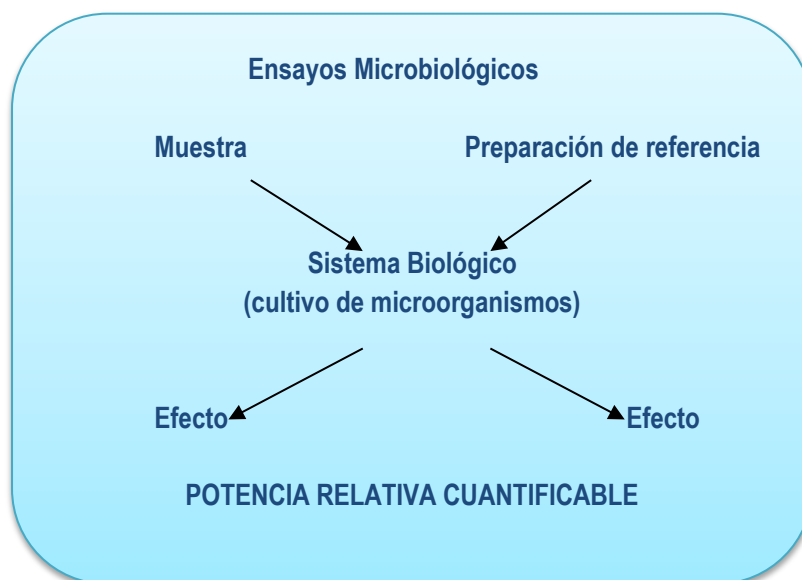
la velocidad de crecimiento, o que la disminuya por efectos tóxicos derivados de altas concentraciones del mismo. Al igual que lo que ocurre con la velocidad de crecimiento, cuando el crecimiento bacteriano es limitado por la baja concentración de un nutriente requerido, el crecimiento neto final o cosecha máxima también aumenta con la cantidad inicial del nutriente limitante.

Además de los nutrientes, muchas bacterias requieren *factores orgánicos de crecimiento*, es decir sustancias que no pueden sintetizar a partir de los nutrientes generales y que cubren requerimientos específicos. Ejemplos de factores de crecimiento son los aminoácidos, las vitaminas y los derivados de purinas y pirimidinas. En estos casos no existe la posibilidad de que un compuesto pueda ser reemplazado por otro, salvo que se trate de un precursor del mismo. No obstante, el efecto de la variación de la concentración del factor de crecimiento sobre la velocidad de crecimiento y la cosecha máxima es análogo al descrito para los nutrientes, aunque con una diferencia sustancial en lo que se refiere a los rangos de concentraciones, que en el caso de los primeros es del orden de nano o picogramos, muy inferior al de los de los nutrientes. Este es el fundamento de los ensayos microbiológicos de vitaminas y otros factores de crecimiento.

Ensayos microbiológicos de factores de crecimiento:

En el punto anterior nos referimos a un aumento de la velocidad de crecimiento debido a un aumento de la concentración de un factor de crecimiento, en el rango de concentraciones limitantes. Esta observación permitió diseñar ensayos sensibles y específicos que permiten cuantificar sustancias hidrosolubles que actúan como factores de crecimiento de diferentes bacterias. Estos ensayos se basan en determinar, a un tiempo dado, el crecimiento de una bacteria de ensayo frente a distintas concentraciones de una preparación de referencia de la sustancia a ensayar y comparar este crecimiento con el que produce una preparación de la misma sustancia cuya actividad se quiere conocer (Figura 6). Debido a su sensibilidad y especificidad, los bioensayos permiten determinar sustancias activas que se encuentran en concentraciones muy bajas, aún en mezclas complejas. Estas propiedades los hacen particularmente útiles no sólo para el control de calidad de productos que contienen una sustancia activa sino también para estudios clínicos y de biodisponibilidad.

Figura 6. Fundamento de los ensayos microbiológicos



Por ejemplo, si deseamos determinar la concentración de vitamina B₁₂ en una solución polivitamínica, debemos disponer de una suspensión de bacterias auxótrofas para vitamina B₁₂, (es decir que no la sintetizan), de un medio de cultivo basal (que no contenga vitamina B₁₂) y de un patrón de vitamina B₁₂ de concentración conocida (preparación de referencia). Se prepara una serie de medios de cultivos que contienen diferentes concentraciones de vitamina B₁₂, agregando diferentes diluciones de la preparación de referencia al medio de cultivo basal. Se siembran esos medios, previamente esterilizados, con la suspensión de la bacteria auxótrofa. A un tiempo dado, se detiene el crecimiento, se mide la absorbancia de los cultivos y se construye una curva de

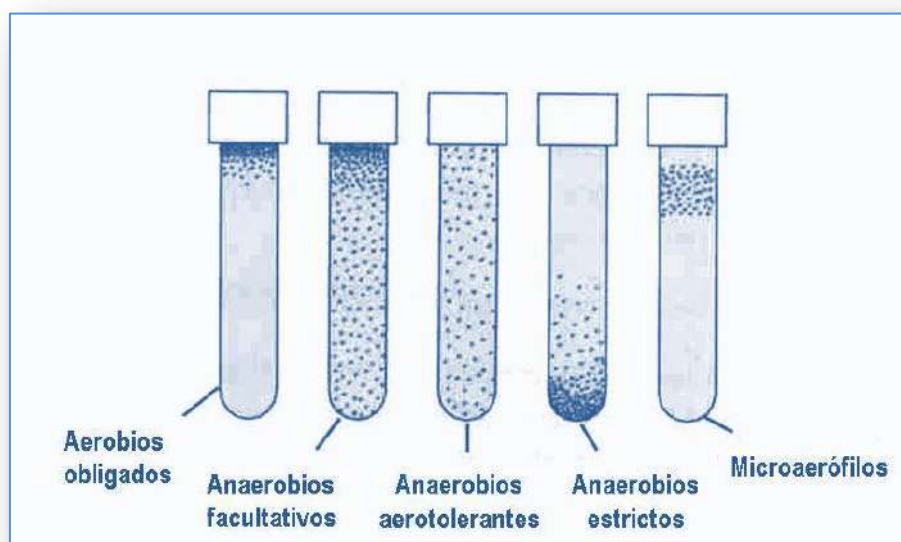
absorbancia versus la concentración de vitamina B₁₂ originalmente presente en los medios. Paralelamente se realiza el mismo procedimiento reemplazando la preparación de referencia por la muestra a analizar. De esta manera se obtienen dos curvas que, si satisfacen los requisitos de regresión, linealidad y similitud, permiten calcular la concentración de vitamina B₁₂ en la muestra. Para más detalles ver el capítulo “Valoración microbiológica de antibióticos y Factores de Crecimiento” en el presente manual.

La composición de los medios de cultivo determina además otras propiedades de los mismos, como ser pH, presión osmótica, actividad de agua, potencial de óxido-reducción, etc., a los que debe sumarse la influencia del ambiente externo, que incluye la atmósfera gaseosa y la temperatura de incubación.

Concentración de oxígeno molecular

De acuerdo a su requerimiento de oxígeno molecular, las bacterias se clasifican en aerobias y anaerobias. Las bacterias aerobias requieren O₂ para crecer; las anaerobias facultativas no requieren O₂, pero cuando está presente lo utilizan; las anaerobias aerotolerantes no requieren ni utilizan O₂, y las anaerobias estrictas no sólo no requieren O₂ sino que les resulta altamente tóxico, induciendo alteraciones metabólicas y la muerte bacteriana. Ver Figura 7.

Figura 7. Clasificación de los microorganismos por su requerimiento y tolerancia al O₂.



El crecimiento de las bacterias aerobias y de las anaerobias facultativas en presencia de O₂ depende de la concentración de oxígeno en solución. Dado que el oxígeno es relativamente insoluble (<10 mg/l), su concentración en los cultivos disminuye rápidamente. En medio sólidos, las bacterias aerobias pueden crecer fácilmente sobre la superficie del medio. En los cultivos líquidos estáticos, el crecimiento aeróbico generalmente ocurre cerca de la superficie en contacto con el aire, pues lejos de ella las condiciones se hacen anaerobias y se impide el crecimiento. Para incrementar el crecimiento es necesario aumentar la superficie de contacto entre las fases líquida y el aire, siendo la forma más utilizada para lograrlo la agitación mecánica o por burbujeo de aire estéril.

El cultivo de bacterias anaeróbicas y en especial de las anaerobias estrictas es realmente un complejo problema técnico en el que aún disponiendo de equipos modernos se requiere un alto nivel de especialización. Puede realizarse en medios sólidos o en medios líquidos, evitando la exposición al O₂. En medios sólidos, pueden cultivarse ya sea sobre la superficie de placas con agar nutritivo, incubadas en una atmósfera libre de oxígeno, o bien dentro de un medio agarizado desoxigenado y solidificado. Para la incubación anaeróbica de los cultivos en placa se usan vasijas de distintos tipos, en los cuales se puede evacuar el aire y llenarlas con nitrógeno puro, con hidrógeno o con una mezcla de cualquiera de estos dos gases y CO₂. A veces el aire es reemplazado por hidrógeno y las últimas trazas de oxígeno son eliminadas por combustión, lo que se efectúa con ayuda de un

catalizador que va incorporado a la vasija.

En medios líquidos, las bacterias anaerobias pueden ser protegidas de los efectos tóxicos del oxígeno mediante la incorporación al medio de un fuerte agente reductor. La inclusión de ascorbato, tioglicolato sódico, cisteína o trazas de sulfito sódico en el medio de cultivo, permite manejar anaerobios que no requieren condiciones rigurosas de exclusión del O₂. El medio puede liberarse del oxígeno disuelto por ebullición y luego protegerse cubriendo su superficie con una capa de aceite mineral. A tales medios se les suele incorporar una pequeña cantidad de agar para aumentar su viscosidad y disminuir la disolución del O₂ del aire.

La manera más útil para medir el grado de anaerobiosis de un medio de cultivo es el potencial de oxidación-reducción o potencial redox (Eh). En medios corrientes, la mayoría de las bacterias anaerobias son inhibidas a valores de Eh mayores que -100 mV, y algunas no inician su crecimiento con potenciales superiores a -330 mV.

Actividad de agua y presión osmótica

Los microorganismos necesitan disponer de agua en el medio para poder crecer. La cantidad de agua disponible en un medio o *actividad de agua* (a_w) depende del efecto osmótico, es decir de su interacción con las moléculas de solutos, y de la posibilidad de adsorción sobre superficies de sólidos. La actividad de agua de un medio es igual a la relación entre la presión de vapor de la solución y la del agua pura:

$$a_w = \frac{P_{\text{solución}}}{P_{\text{agua}}}$$

Puede calcularse a partir de la humedad relativa en una cámara sellada en la que se ha alcanzado el equilibrio entre el medio de cultivo y el aire (por ejemplo, si la humedad es del 95%, la actividad de agua del medio es 0,95).

La actividad de agua está inversamente relacionada a la presión osmótica (π): a mayor presión osmótica, menor a_w .

$$\pi = -\frac{RT}{V} \ln a_w$$

donde R es la constante gaseosa,
 T es la temperatura absoluta
 V es el volumen de 1 mol de agua

La mayoría de las bacterias tienen valores óptimos de a_w superiores a 0.98. Las variaciones en la a_w pueden afectar la velocidad de crecimiento, la composición celular y las actividades metabólicas de las bacterias; por ello la desecación o el agregado de grandes cantidades de sales o azúcares son métodos muy efectivos para preservar los alimentos de la contaminación microbiana. Es bien conocido que los jarabes y las jaleas son poco susceptibles a la contaminación bacteriana.

Los microorganismos denominados *osmotolerantes* que pueden retener agua y mantener una alta concentración interna de solutos, son capaces de crecer en un amplio rango de actividad de agua o presión osmótica. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* puede cultivarse en medios que contienen concentraciones de cloruro de sodio de hasta 3 moles por litro; y algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, en soluciones de azúcares de $a_w = 0.6$. Algunas bacterias halófilas crecen mejor en altas concentraciones de cloruro de sodio y $a_w \approx 0.80$.

pH

Aunque algunas bacterias pueden crecer a pH 1.0 y otras a pH 11.0, la mayoría de las especies bacterianas crecen en un rango estrecho de pH. Cada especie crece en un rango definido de pH y posee un pH óptimo de crecimiento: las *acidófilas* entre 0 y 5.5, las *neutrófilas* entre 5.5 y 8.0 y las *alcalófilas* entre 8.5 y 11.5. En general, una disminución del pH produce una disminución de la velocidad de crecimiento. Este fenómeno es utilizado desde hace muchísimo tiempo para aumentar la vida útil de alimentos lácteos (leches acidificadas,

yogur, etc.).

Los cambios de pH del medio pueden modificar la ionización de los nutrientes y reducir su asimilación por los microorganismos. A pesar de las amplias variaciones de pH del medio, el pH interno de la mayoría de las bacterias se mantiene próximo a la neutralidad. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicarlo: impermeabilidad de la membrana a protones, intercambio de iones sodio o potasio por protones, etc. Sin embargo, variaciones drásticas de pH pueden inhibir la actividad de enzimas y proteínas transportadoras de membrana, y si el pH interno de las células disminuye mucho, las bacterias mueren.

Muy frecuentemente, los microorganismos provocan el cambio del pH de su propio hábitat pues producen y liberan metabolitos ácidos o básicos. Por ejemplo, es bien conocido que la fermentación de hidratos de carbono produce ácidos orgánicos y que la degradación de aminoácidos genera amoníaco. El pH de los cultivos se controla usualmente incorporando al medio soluciones *buffers* (por ejemplo, mezclas de fosfatos monoácido y diácido), aunque su potencial regulador es limitado. Para un control más eficiente se debe recurrir a la adición automática de ácidos o bases.

Algunos medios de cultivo tienen incorporados indicadores de pH, cuyo viraje indica determinada actividad metabólica. Se usan para identificar microorganismos

Temperatura

Además de la composición de los medios de cultivo un factor muy importante que afecta la velocidad de crecimiento es la temperatura de incubación. Del mismo modo que para los nutrientes, puede definirse una temperatura óptima como la que posibilita la mayor velocidad de crecimiento. Por debajo de la temperatura óptima puede definirse un rango más o menos extendido de temperaturas en las que las bacterias crecen aunque con velocidades cada vez menores a medida que nos alejamos de la temperatura óptima. Éste es el fundamento del alargamiento de la vida útil de un producto conservado a temperaturas de refrigeración. Por encima de la temperatura óptima la velocidad de crecimiento también disminuye pero el rango de temperaturas compatibles con el crecimiento es muy estrecho, pues el aumento de la temperatura produce desnaturalización de las proteínas. Por esta razón, la temperatura máxima está mucho más cerca de la óptima de lo que lo está la temperatura mínima (Figura 8). Si bien en su conjunto los microorganismos son capaces de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, no todas las especies tienen la misma temperatura óptima ni el mismo rango de temperaturas compatibles con el crecimiento. Existen especies capaces de desarrollar a temperaturas superiores a 40°C (*termófilas*), otras que lo hacen entre 20°C y 40°C (*mesófilas*) y otras a temperaturas inferiores a 20°C, incluso a temperaturas de refrigeración (*psicrófilas*) (Figura 8).

Las bacterias termófilas tienen algunas aplicaciones interesantes. Por ejemplo, las endosporas de *Geobacillus stearothermophilus* se utilizan como indicadores biológicos de los procesos de esterilización por vapor saturado a presión superior a la normal. *Thermus aquaticus* y *Thermococcus litoralis* producen las polimerasas Taq y Vent, respectivamente, ambas de uso muy extendido en la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

Es evidente que el calor ejerce una acción deletérea en la mayoría de los microorganismos. Temperaturas elevadas son el agente esterilizante de elección cuando los materiales son resistentes a ellas, como se verá en el capítulo “Esterilización” del presente manual. Por otra parte, el frío se usa para la conservación de microorganismos viables.

Otros factores físicos que pueden afectar el crecimiento son la *presión hidrostática* y las *radiaciones*, principalmente ionizantes y ultravioleta. En cuanto a la presión, sólo es importante en bacterias capaces de crecer en las profundidades de océanos. Las radiaciones ionizantes son dañinas para las bacterias, ya que en bajos niveles producen mutaciones, que pueden ser letales, pero en altas dosis son directamente letales; a tal punto que se utilizan como agentes esterilizantes.

Las consideraciones anteriores también permiten comprender por qué los tejidos del organismo humano resultan particularmente aptos para la sobrevivencia y multiplicación de muchas especies microbianas, principalmente las quimioheterótrofas mesófilas con rango de pH óptimo cercano a la neutralidad. Como es sabido, en la mayoría de las enfermedades de origen microbiano se requiere una concentración umbral de una especie microbiana para producir una enfermedad, concentración que dependerá de su mecanismo de patogenia, de su virulencia y de las condiciones inmunológicas del huésped. Estas consideraciones justifican, de alguna manera, los requisitos de esterilidad, biocarga máxima y ausencia de determinadas especies en productos no estériles.

Figura 8. Clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus temperaturas cardinales

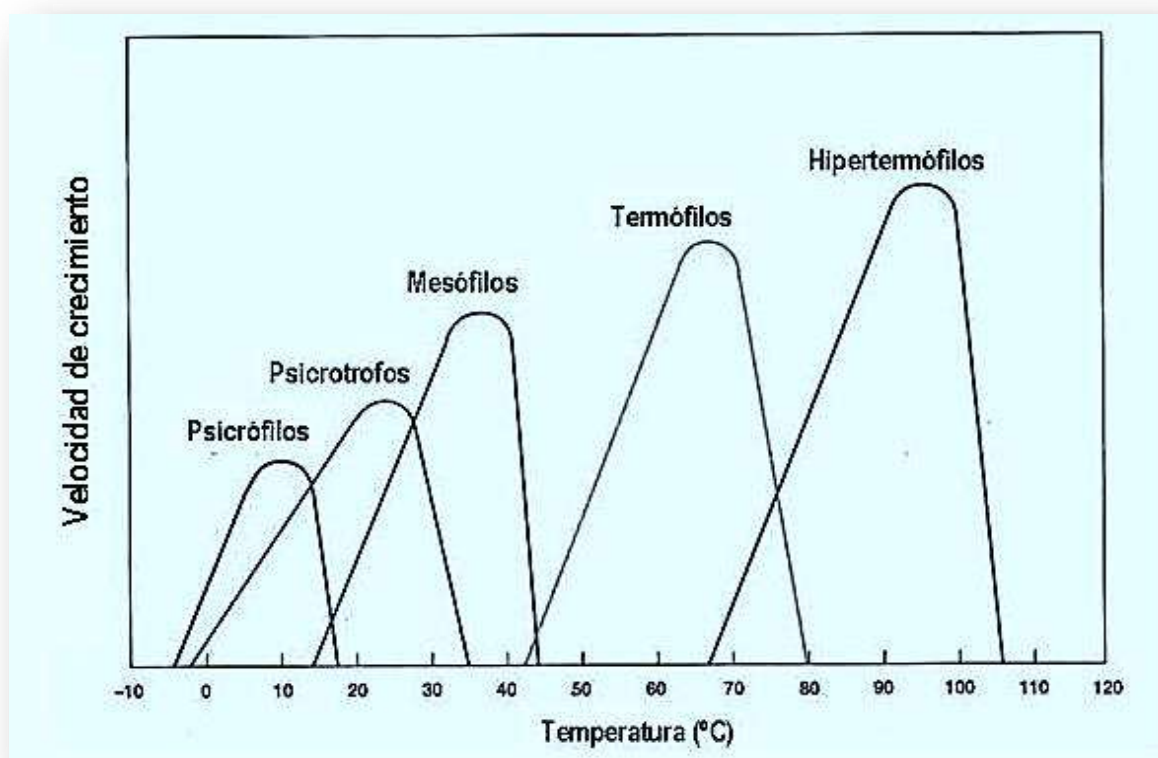


Figura 9. Esquema de quimiostato

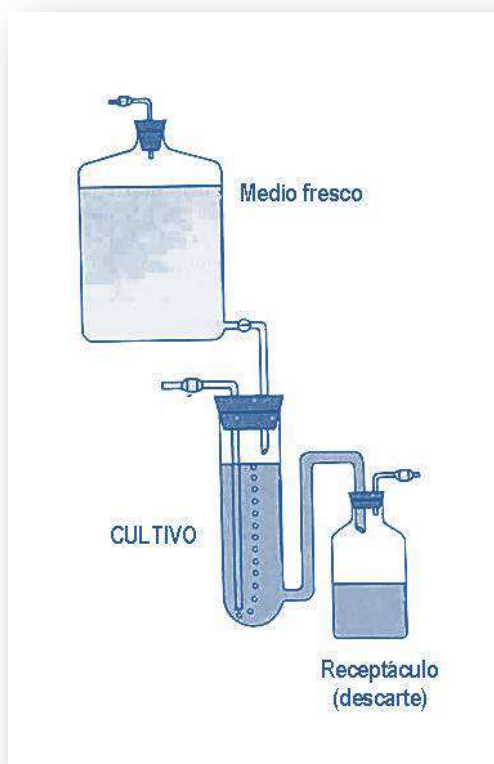
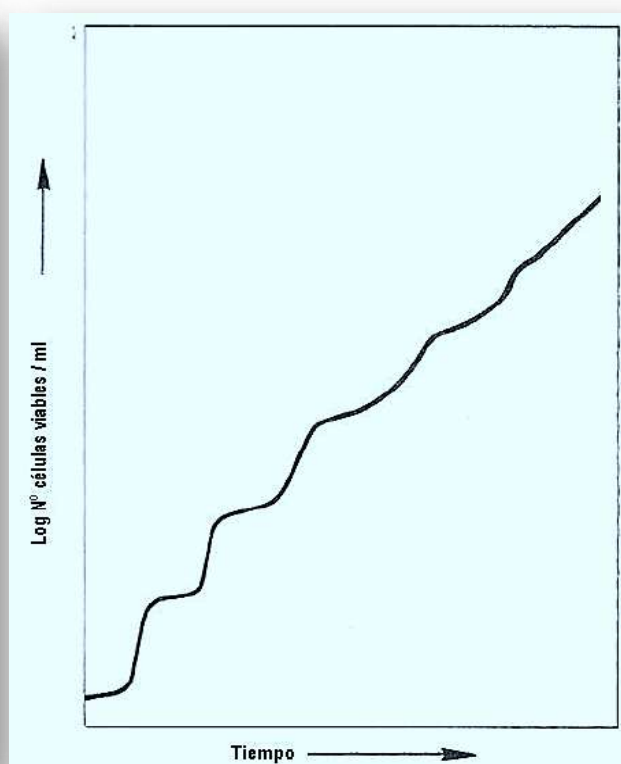


Fig. 10. Crecimiento de cultivos sincronizados



Cultivo continuo

Cuando las bacterias se cultivan en un ambiente cuya composición se mantiene constante porque se le agregan continuamente nutrientes y se eliminan productos de desecho, *la población bacteriana se mantiene en fase de crecimiento exponencial y la concentración de masa es constante*. Estas condiciones se alcanzan en el laboratorio a través de un sistema de cultivo continuo, siendo los más usados: 1) quimiostatos y 2) turbidostatos.

1) En un quimiostato se eliminan alícuotas de cultivo que son reemplazadas con la misma velocidad por medio de cultivo fresco que posee un nutriente (por ejemplo, un aminoácido) en concentración limitante (Figura 9). La velocidad de crecimiento está determinada por la velocidad de incorporación del nutriente limitante y la concentración celular por la concentración de dicho nutriente.

2) Un turbidostato tiene una fotocélula que mide la turbidez del cultivo, regulando la velocidad de flujo del medio para mantener una turbidez predeterminada.

Los sistemas de cultivos continuos son muy útiles para realizar estudios en condiciones que simulan las presentes en ambientes naturales.

Cultivo sincronizado

Hemos dicho que si bien las bacterias se dividen a intervalos de tiempo regulares, la velocidad de crecimiento de un cultivo en la fase exponencial aparece corrientemente como una función continua. Esto se debe a que todas las bacterias no se dividen simultáneamente. Se pueden obtener *cultivos sincronizados*, en los que las bacterias se dividen al mismo tiempo (Figura 10), modificando propiedades físicas del ambiente o la composición química del medio de cultivo. Por ejemplo, si la temperatura o la concentración de un nutriente esencial son muy inferiores a los valores óptimos, la actividad metabólica será muy baja y las células no se dividirán. Cuando se aumente rápidamente la temperatura de incubación o la concentración del nutriente esencial, las bacterias se dividirán sincronizadamente. También se pueden sincronizar cultivos seleccionando células por tamaño o por edad. Lamentablemente, el estado de sincronización dura muy pocas generaciones, pues los ciclos celulares individuales no tienen la misma duración.

Los cultivos sincronizados permiten estudiar etapas particulares del ciclo celular, que por razones técnicas no es posible realizar.

Bibliografía recomendada

Franco, M. *Crecimiento bacteriano*. En Programa de Educación y Actualización Farmacéutica (PROEF). Primer Ciclo – Módulo 3. 1999. Cap. 2, pp. 33-51- Editorial Médica Panamericana. ISSN: 1514-1551.

Franco Mirta (2006) *Nutrición y Crecimiento bacteriano*. En Microbiología Biomédica, 2ª ed. J.A.Basualdo, C.E. Coto y R.A. de Torres (eds.), pp 83-99. Editorial Atlante SRL. Argentina. ISBN: 950-9539-47-3.

Gerhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg and Phillips. *Manual of Methods for General Bacteriology*, 1981. Cap. 10-11, pp. 65-207. American Society for Microbiology.

Hugo & Russell's. *Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. 2004. Cap. 3, pp. 32-38. Edited by Stephen P. Denyer, Norman A. Hodges & Sean P. Gorman. Blakwell Science. ISBN 13: 978-0-632-06467-0.

Prescott – Harley- Klein. *Microbiología*, 5ª ed. 2004. Cap. 6, pp. 118-142. Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. ISBN 84-486-0525-X

Tortora – Funke – Case. *Introducción a la Microbiología*. 9ª edición, 2007. Cap. 6, págs. 159-183. Editorial Médica Panamericana. ISBN 978-950-06-0740-7

Fuentes de contaminación microbiana de productos farmacéuticos y cosméticos

María Cristina Fernández

- Introducción
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella sp*
- *Clostridium spp*
- Hongos filamentosos y levaduras
- *Candida albicans*

Introducción

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos y cosméticos ha sido extensamente estudiada tanto a nivel nacional como internacional. Los productos para administración parenteral y de uso ocular deben ser estériles. Existen otras formas farmacéuticas no obligatoriamente estériles que se usan por vía oral, tópica, nasal, vaginal, etc, fabricadas con ingredientes que pueden ser sustratos adecuados para los microorganismos. Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Las materias primas naturales, el equipamiento, el agua, los operadores, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos ⁽¹⁾.

La U.S. Food and Drug Administration (FDA) reconoce tres categorías de microorganismos: patógenos, oportunistas y objetables:

Patógenos son aquellos microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar al hombre (*Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium spp*, etc).

Se consideran **oportunistas** a aquellos microorganismos que producen enfermedad en pacientes inmunocomprometidos.

Y son **objetables** aquellos microorganismos que pueden inactivar drogas activas y/o deteriorar el producto provocando una posible falta de eficacia de los productos farmacéuticos y seguridad en cosméticos.

Un medicamento o un cosmético se consideran contaminados si contiene microorganismos patogénicos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o si presentan deterioro físico o químico. Los microorganismos con requerimientos nutricionales simples tienden a estar presentes en alto número, mayor de 10⁶ ufc/g o ml, a pesar de que el producto no muestre signos visibles de contaminación.

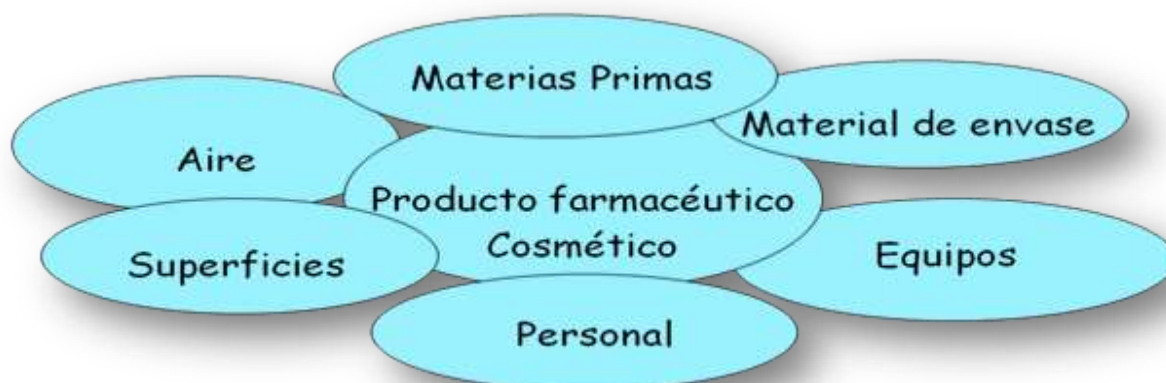
La dosis infectiva de los microorganismos no sólo varía entre las especies sino también entre los individuos. Los síntomas y consecuencias de las infecciones por medicamentos o cosméticos contaminados son diversos. Las reacciones clínicas, varían desde una infección local de heridas, infecciones gastrointestinales por productos orales contaminadas en el caso de productos no estériles, a infecciones sistémicas serias por productos

inyectables contaminados.

Sólo unas pocas materias primas empleadas para la fabricación de productos farmacéuticos son estériles. Controles ambientales, del agua, de las materias primas, de limpieza de equipos y áreas, buenas prácticas de higiene del personal son vitales para minimizar el tipo y número de microorganismos presentes.

En la Figura 1 podemos ver cuales son las fuentes más comunes de contaminación de medicamentos y cosméticos.

Figura 1. Fuentes de contaminación más frecuentes de productos de uso y consumo humano



Muchos microorganismos pueden llegar a producir toxinas constituyendo un riesgo sanitario especialmente en formas farmacéuticas orales (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y hongos filamentosos) o pueden provocar el deterioro de un producto cosmético o de un medicamento como consecuencia de su crecimiento alterando sus características organolépticas. Otros microorganismos patógenos pueden producir distintas enfermedades en los usuarios dependiendo del grado de contaminación y de la susceptibilidad del consumidor. En general los grupos etarios más sensibles son los lactantes, niños y ancianos.

A continuación describiremos los microorganismos contaminantes más comúnmente investigados en medicamentos y cosméticos:

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, y es uno de los más importantes patógenos dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* con respecto al número y tipo de infecciones que causa y su relación con la alta morbilidad y mortalidad relacionada ⁽²⁾.

Este microorganismo combina perfectamente su adaptabilidad a diferentes ambientes con una gran variedad de factores de virulencia. El espectro de enfermedades causadas por este agente varía desde una infección superficial de piel hasta una sepsis.

La patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* se explica por su gran variedad de factores de virulencia. Un pili polar media la adherencia de este microorganismo a las células epiteliales. Una vez adherida la bacteria produce proteasas, hemolisinas, exotoxinas y endotoxinas que producen daño tisular. El papel de una elastasa, una de las proteasas producida por *P. aeruginosa*, ha sido documentada en su patogénesis de queratitis, infecciones de heridas y enfermedades crónicas de pulmón en pacientes con fibrosis quística ⁽³⁾.

El rol de la presencia de una exotoxina A en la patogénesis de las infecciones por *P. aeruginosa* es desconocido, pero esta toxina podría estar asociada con la diseminación de este microorganismo y su toxicidad sistémica ⁽²⁾.

Los individuos inmunocomprometidos son las comunidades más afectadas por infecciones por *P. aeruginosa* y las causas están frecuentemente asociadas con contaminación de agua y de soluciones acuosas. La infección superficial más asociada con este microorganismo es la foliculitis e infecciones del canal auditivo.

La infección de *P. aeruginosa* en ojos está frecuentemente asociada al uso de lentes de contacto y de soluciones de lavado de lentes de contacto contaminadas con este microorganismo. Esta infección puede llegar a producir úlceras de córnea que pueden progresar a una pérdida de la función ocular si no es adecuadamente tratada ⁽⁴⁾.

La infección más severa causada por este microorganismo es la endocarditis por administración endovenosa de medicamentos, cuando, al ser inyectados, son disueltos o suspendidos en vehículos acuosos que, si están contaminados con *P. aeruginosa* pueden llegar a producir bacteriemia que puede evolucionar a una endocarditis⁽²⁾.

De ahí la importancia de investigar la presencia de *P. aeruginosa* en productos farmacéuticos que van a ser administrados por vía inhalatoria y ocular como así también en vehículos acuosos.

Los cosméticos también pueden ser vehículo de este microorganismo en especial los líquidos y cremas.

Pseudomonas aeruginosa y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de *biofilms*. Estas estructuras una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes.

Los *Biofilms* (o biopelículas) son masas de microorganismos vivos o muertos que se acumulan dentro de los reservorios de agua, cañerías u otras superficies inertes como acero inoxidable de equipos y mesadas. Otros organismos o materiales pueden ser atrapados en las láminas del *biofilm*, incluyendo nematodos, algas, bacterias, hongos y depósitos minerales. La densidad bacteriana en el *biofilm* puede estar en el orden de 10^5 a 10^8 ufc/cm².

Durante los últimos años se realizaron estudios genéticos que ayudaron a comenzar a entender el complejo proceso de desarrollo de la formación de un *biofilm*. Ver capítulo de *Biopelículas* en el presente manual.

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* está ampliamente distribuido en la naturaleza, se lo encuentra en la piel y mucosas de humanos y de otros primates. Es frecuentemente encontrado en la boca, sangre, glándulas mamarias, intestino, tracto genitourinario y vías aéreas respiratorias de sus huéspedes. *Staphylococcus aureus* se trata de un coco Gram positivo perteneciente a la familia Micrococcaceae.

Está bien documentado que *S. aureus* es un patógeno oportunista humano y es una de las mayores causas de infecciones agudas y piogénicas; si no es tratada, puede extenderse al tejido circundante o por vía de una bacteriemia a otros órganos. Muchas de las infecciones causadas por *S. aureus* envuelven la piel con episodios de celulitis, impétigo, e infecciones post operatorias en diversos sitios. Otras infecciones mayores en las que está implicado este microorganismo son: bacteriemia, neumonía, osteomielitis, endocarditis aguda, meningitis, abscesos en músculo, entre otros.

La presencia del género *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, o sea los operadores. Estos microorganismos pueden ser transportados por el polvo, piel, ropa y microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y stornudar ⁽⁵⁾.

Escherichia coli

El tracto gastrointestinal de los animales contiene siempre microorganismos. Se pueden encontrar microorganismos patógenos reconocidos como *Salmonella* y *Shigella*, y otros microorganismos nativos como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, enterococos, lactobacilos, diversos miembros de la familia Enterobacteriaceae, clostridios y una gran variedad de protozoos.

Los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos que fermentan la glucosa. Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, suelos y en el intestino de humanos y animales. Están asociados con muchos tipos de infecciones como abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones intestinales, urinarias y heridas.

Escherichia coli es parte de la flora normal fecal de humanos y animales inferiores, Sin embargo algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario, de heridas y entéricas, ocasionalmente pueden producir

septicemia y meningitis. Las cepas de *E. coli* más importantes que pueden causar episodios severos de diarrea se detallan en la Tabla 1.

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por presentación aguda de daño renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central. Esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa y de características endemoepidémicas, que está precedida por un período prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta, y que puede presentar además fiebre, vómitos y dolor abdominal. La forma atípica puede ser desencadenada por distintos cuadros como neoplasias, hipertensión arterial, rechazo de trasplante renal, uso de anticonceptivos orales, drogas, post parto, etc.

Tabla 1: Propiedades de las distintas *E. coli* que pueden causar infecciones entéricas

Cepa	Mecanismo patogénico	Infección entérica	Presentaciones clínicas comunes	Grupo etario más común	Factor de riesgo más común
EPEC (<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico)	LT y ST Toxinas	Diarrea del viajero	Diarrea acuosa, dolores abdominales, náuseas, deshidratación	Adultos y niños	Viajes
EPEC (<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno)	Adherencia	Diarrea aguda	Diarrea acuosa, fiebre, vómitos, mucus en heces	Niños menores a 2 años de edad y adultos	Edad menor a dos años
EIEC (<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo)	Invasión y destrucción de la mucosa del epitelio intestinal	Disentería similar a la de <i>Shigella dysenteriae</i>	Disentería, sangre mucus y leucocitos en heces, fiebre, dolores abdominales	Adultos	Viajes
EHEC (<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico)	Toxinas shiga-like	Diarrea, colitis hemorrágica	Diarrea, dolores abdominales, sangre en heces, SUH (Síndrome urémico hemolítico)	Niños y ancianos	Consumo de carne cruda o mal cocida
EAggEC (<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo)	Desconocido	Diarreas agudas y crónicas	Diarrea acuosa y vómitos	Todas las edades	Desconocido

Se ha reconocido a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), como agente causal de la forma postentérica de SUH. Otros agentes infecciosos como *Shigella dysenteriae* tipo 1, *Campylobacter* sp., *S. pneumoniae*, entre otros, han sido asociados a casos de SUH. *Escherichia coli* O157:H7, identificado por primera vez como patógeno humano en 1982, es el serotipo prevalente asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica (CH) y SUH. Sin embargo, más de 100 serotipos poseen un potencial patogénico similar. A un subgrupo de serotipos de STEC (O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM; O157:H7), asociado a enfermedad severa en el hombre, se lo denomina *E. coli* enterohemorrágico. Se han clasificado a las cepas STEC en cinco sero-tipos (A-E) teniendo en cuenta su potencial patogénico y epidémico, su asociación a enfermedades severas en el hombre y su capacidad para producir brotes ⁽⁶⁾.

Su presencia en un producto de uso o consumo humano implicaría una posible presencia de contaminación fecal en especial en productos de consumo oral y en materias primas de origen natural.

El género *Salmonella*

Salmonella sp., es un miembro de la familia Enterobacteriaceae que puede causar muchos tipos de infecciones desde una gastroenteritis autolimitante hasta afecciones generalizadas como la fiebre tifoidea y paratifoidea. Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Se distinguen más de 2000 serotipos según una clasificación basada en antígenos somáticos (O) y flagelares (H), conocido como esquema de Kauffmann- White. Sin embargo las salmonelas que afectan al hombre constituyen un número reducido. La enfermedad más común producida por el género *Salmonella* es la enterocolitis autolimitante con episodios febriles y diarrea generalmente con una duración de siete días.

Una vez que se han ingerido las salmonelas con un producto contaminado pasan a través del estómago y comienzan a multiplicarse y se adhieren al borde en cepillo de las células epiteliales que tapizan la porción distal del intestino delgado del colon. Luego las bacterias penetran en las células de la mucosa que resulta dañada, y migran a la lámina propia de la región ileocecal. Tras una posterior multiplicación en los folículos linfoides se desarrolla una respuesta leucocítica seguida de hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Esta respuesta inflamatoria también induce la liberación de prostaglandinas, que estimulan el cAMP y produce una activa secreción de fluidos que se manifiesta en una diarrea profusa. Típicamente el período de incubación es de aproximadamente 12 a 36 horas.

Las salmonelas se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza y como flora normal del tracto intestinal de animales y humanos. Se distinguen de otros microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales en que su presencia puede ser habitual en materias primas de origen natural, en especial aquellas de origen animal. Posee una gran habilidad de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, alcanzando recuentos muy elevados. Pueden ser fácilmente diseminadas y transmitidas de una persona a otra. Puede producirse un prolongado período de excreción del microorganismo tras la infección produciéndose lo que se conoce como estado de portador.

Dada la etiología de este microorganismo es de fundamental importancia su investigación en materias primas de origen natural.

Clostridium spp

Las bacterias anaerobias producen todo tipo de enfermedades al igual que las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, y pueden pasar inadvertidas en el diagnóstico si no se emplean técnicas adecuadas.

Las bacterias anaerobias son las que no requieren oxígeno como aceptor terminal de electrones para su desarrollo o actividades metabólicas. Si bien pueden poseer ciertos citocromos, los anaerobios carecen de los citocromos que se requieren para transferir electrones al oxígeno molecular; por lo que su energía proviene de reacciones de fermentación.

Están ampliamente distribuidas en los medios naturales, fundamentalmente en el suelo o ambientes relacionados con polvo ambiental que poseen una baja tensión de oxígeno y bajo potencial redox. En el ser humano las bacterias anaerobias residen como flora normal en la piel y mucosas de nasofaringe, orofaringe, boca, tracto gastrointestinal, uretra y vagina. Con pocas excepciones, como por ejemplo el *Clostridium botulinum*, las bacterias anaerobias patógenas son parte de la flora normal en uno o más de los sitios nombrados y pueden ser patógenos oportunistas. El *Clostridium perfringens* habita en el tracto gastrointestinal y puede hallarse en la piel perianal de individuos sanos.

Las infecciones por anaerobios pueden afectar cualquier región del cuerpo, siempre que las condiciones en los tejidos sean favorables. Los anaerobios están comúnmente involucrados en abscesos de cualquier órgano, colitis, apendicitis, bacteriemia, otitis media crónica, celulitis crepitante, infecciones dentales y orales, endocarditis y endometritis.

El género *Clostridium* está formado por un grupo heterogéneo de bacilos grampositivos anaerobios esporoformadores. Está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el tracto intestinal de muchas especies animales incluido el hombre, y puede causar infecciones de origen exógeno y de origen endógeno. En la actualidad se han descrito más de 150 especies, aunque sólo alrededor de 30 han sido asociadas con infección humana, siendo *Clostridium perfringens* la especie más frecuente.

Diversas afecciones de piel y tejidos blandos están asociadas con especies de *Clostridium*. Las más

características y graves son la celulitis por *Clostridium* o celulitis crepitante y la mionecrosis por *Clostridium* o gangrena gaseosa.

La celulitis crepitante es una infección que afecta característicamente a los tejidos subcutáneos o retroperitoneales donde el músculo no está envuelto en una extensión significativa y permanece viable. Los hallazgos en el lugar de la infección incluyen crepitación a la palpación por la presencia de gas, a menudo más abundante que en la mionecrosis, dolor mínimo, edema, ligera decoloración de la piel y exudado oscuro, frecuentemente maloliente, que en la tinción de Gram suele mostrar células bacterianas típicas y abundantes neutrófilos. Con un periodo de incubación de 3 días o más y con mínima toxicidad.

La gangrena gaseosa es una infección que puede surgir principalmente después de un traumatismo, como complicación de una herida penetrante y extensa, usualmente en una extremidad y con gran afectación de la masa muscular, o bien como complicación de una cirugía, principalmente de colon o tracto biliar, o después de un aborto séptico, parto u otra manipulación obstétrica. El traumatismo introduce al microorganismo, en su forma vegetativa o sus esporas, en los tejidos profundos y produce un ambiente anaerobio que favorece el crecimiento de éste y la producción de sus toxinas.

El *Clostridium botulinum* es un bacilo Gram positivo, anaerobio obligado y formador de endosporas. Produce neurotoxinas con una dosis letal mínima entre 0,1 y 1,0 microgramos que se destruyen con unos pocos minutos de hervor. La neurotoxina se absorbe, se asocia a la unión neuromuscular de los nervios afectados e inhibe la liberación de acetilcolina provocando una parálisis neuromuscular con fallo respiratorio en 24 horas. Los principales síntomas del botulismo aparecen generalmente entre 12 y 36 horas después de la ingesta de un producto contaminado. Sin embargo, en ciertos casos, el periodo de incubación puede prolongarse a 8 días dependiendo en gran parte de la dosis de toxina ingerida. Se observan vértigos, dificultad para tragar, voz pastosa, debilidad en los miembros y visión borrosa. Los problemas respiratorios son causados por la parálisis respiratoria que puede conducir a la muerte por simple asfixia.

Se han identificado otros dos tipos de botulismo conocidos como botulismo de las heridas y botulismo infantil.

La presencia de microorganismos anaerobios especialmente los pertenecientes al género *Clostridium* suele encontrarse en materias primas de origen natural, talco, almidón, etc y también en hierbas medicinales y medicamentos fitoterápicos.

Hongos filamentosos y levaduras

Muchos hongos saprófitos, mohos y levaduras ambientales suelen estar ligados a contaminaciones de medicamentos y cosméticos.

Los hongos son organismos eucariotas, es decir que presentan núcleo verdadero con membrana nuclear y cromosomas. Esta característica los distingue de las bacterias, organismos procariotas sin núcleo y con un solo cromosoma libre en el citoplasma.

Desde el punto de vista nutricional son heterótrofos, al igual que los animales, ya que no sintetizan la materia orgánica a partir de CO₂. Los hongos requieren, a diferencia de las plantas, de fuentes de carbono orgánicas, pero a diferencia de los animales debido a la pared que presentan por absorción de nutrientes solubles en lugar de hacerlo por ingestión de alimentos particulados seguida de digestión. Los hongos digieren los alimentos externamente liberando enzimas y ácidos que hidrolizan las macromoléculas del sustrato y absorben las subunidades (nutrición absorbente).

Los hongos patógenos aislados con más frecuencia son cepas de *Aspergillus* y *Candida*.

Aspergillus fumigatus y *Aspergillus flavus* son mohos que producen micosis sistémica en pulmón llamada Aspergillosis.

La levadura *Candida albicans*, que es huésped normal de la flora intestinal del hombre, produce candidiasis superficial o sistémica en personas debilitadas, en recién nacidos y en ancianos con sistema inmunológico deficiente.

Los hongos saprófitos oportunistas, tanto mohos como levaduras, pueden producir alergias y micosis secundarias comportándose como verdaderos patógenos.

Los hongos toxicogénicos son frecuentes en todo tipo de productos siendo los más importantes *A. flavus* y *A. parasiticus*, productores de aflatoxinas. Las aflatoxinas, metabolitos secundarios hepatotóxicos y potentes carcinogénicos, deben ser consideradas como indicadores de riesgo tóxico. El empleo de decontaminantes, si bien garantiza la ausencia de estos hongos toxicogénicos, no asegura la destrucción de la toxina porque estos metabolitos son resistentes al calor y a los tratamientos que reciben las materias primas de origen natural como por ejemplo la descontaminación por radiación ionizante.

Los productos más susceptibles a la contaminación fúngica son las soluciones oftálmicas, ungüentos, supositorios, pomadas y en cosméticos, jabones y talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos. Los excipientes y materias primas derivados de cereales, son también óptimos sustratos para el desarrollo de cepas de *A. flavus*, productores de aflatoxinas. Las hierbas medicinales y medicamentos fitoterápicos pueden ser vehículos también de estos microorganismos.

Candida albicans: Las levaduras son esencialmente hongos unicelulares que aunque son morfológicamente simples constituyen un grupo altamente especializado asociados con ambientes nutricionales muy dispares. Unas pocas especies de levaduras son potencialmente patógenas para el hombre aunque muchas están relacionadas con procesos de alteración de producto.

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Puede asumir patogenicidad provocando candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del tracto gastrointestinal, o de la piel.

BIBLIOGRAFIA

1. Bombliés, L.; WeiB, C. and Beckmann, G. *Examination of Microbiological Quality of Pharmaceutical Raw Materials*. Pharmeuropa Scientific notes 2007-1; 1-7.
2. Pollack, M. 1990. *Pseudomonas aeruginosa*, p 1673-1691. In *Principles and Practice of Infections Diseases*. G.L. Mandell, R.G. Douglas Jr., and J. E. Bennett (ed) 3rd ed. Churchill Livingstone, New York.
3. Holder, I.A. 1993. *Pseudomonas aeruginosa virulence associated factors and their role in burn wound infections*, p. 235-245. In *Pseudomonas aeruginosa: the Opportunist*. R.B. Fick Jr. Ed. CRC. Press, Inc, Boca Raton, Fla.
4. Holland, S.P., Pulido J.S., Shires T.K., and Costerton J.W. 1993. *Pseudomonas aeruginosa ocular infections*, p 159-176. In *Pseudomonas aeruginosa: the Opportunist*. R.B. Fick Jr. (ed), CrC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
5. Wesley E. Kloos and Tammy L. Bannerman. *Staphylococcus and Micrococcus*, 2005. Chapter 22. p 282-293. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue N.W. Washington DC. 2005.
6. Rivas, M., Miliwebsky, E; Chinen, Isabel, Deza, N., Leotta G. *Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina*. MEDICINA (Buenos Aires) 2006; 66 (Supl. III): 27-32.

Medios de cultivo

Héctor Cerra

- *Introducción*
- *Clasificación*
- *Recepción*
- *Preparación*
- *Etiquetado*
- *Esterilización*
- *Almacenamiento*
- *Control de esterilidad*
- *Test de promoción de crecimiento*
- *Documentación*
- *Validación de la fecha de vencimiento*
- *Bibliografía consultada*

Introducción:

Un medio de cultivo es aquella solución que contiene los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar los microorganismos bajo las condiciones favorables de temperatura y pH. Debido a la variabilidad de los resultados microbiológicos, el tema de los medios de cultivo juega un rol importante, junto a otros principios, dentro de las buenas prácticas de un laboratorio de Microbiología. Ya que un medio de cultivo es la base para la mayoría de los análisis microbiológicos, todo lo referente a su calidad es crítico para el éxito de un laboratorio de Microbiología. Es también uno de los puntos clave que requieren gran atención en la Inspecciones y Auditorías porque si los medios de cultivo no están apropiadamente preparados y controlados, los resultados del laboratorio pueden ponerse en duda.

El desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son completamente ajenos al propio medio:

1. *Disponibilidad de nutrientes adecuados*

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, la preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivo provocaba la pérdida de los factores nutritivos lábiles. Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros

compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añaden sustancias como suero, sangre, etc. Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica.

Muy a menudo se añaden al medio de cultivo ciertos colorantes, bien como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien por sus capacidades de actuar como inhibidores selectivos de ciertos microorganismos.

2. Consistencia adecuada del medio

Partiendo de un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido o sólido. Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y de que otros tienen la capacidad de licuarla.

Actualmente los medios sólidos son de uso universal, por su versatilidad y comodidad, pero hay también gran cantidad de medios líquidos cuyo uso está ampliamente extendido en el laboratorio.

3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones.

4. Condiciones adecuadas de humedad

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos.

Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37 °C cuando sea necesario que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se desecue el medio.

5. Luz ambiental

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos.

6. pH.

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

7. Temperatura

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43 °C. Otros como los psicrófilos crecen a 0° C y los termófilos a 80° C o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos).

En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más reducidos, alrededor de 37° C, y los saprófitos desarrollan en rangos más amplios.

8. Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles:

- para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios.
- para que el resultado obtenido sea el correspondiente al nivel de contaminación de la muestra a analizar.

Clasificación:

A continuación clasificaremos los medios de cultivo según su consistencia, su utilización, su composición y su origen:

1. Según su consistencia (estado físico):

Según su consistencia, los medios de cultivo pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos.

1.1. *Medios líquidos*: Como se presentan en ese estado son llamados también caldos.

1.2. *Medios sólidos*: Se preparan a través de medios líquidos agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados con la gelatina y el agar.

La gelatina es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene la limitación de que es hidrolizada por muchas bacterias y porque su punto de fusión es bajo.

El agar agar es un polímero de azúcares obtenido de algas marinas. Es una molécula insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente. Una solución de 1,5 % forma un gel firme entre 32 y 39 °C.

1.3. *Medios semisólidos*: Se preparan a partir de los medios líquidos agregándoles un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus principales usos es para la investigación de la movilidad de los microorganismos. Poseen 0,15 % de agar.

2. Según su utilización:

Según su utilización los medios de cultivo pueden clasificarse en medios comunes, medios de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, de identificación, de conservación y de transporte.

2.1 *Medios comunes*: Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de microorganismos que no necesiten requerimientos especiales. El más conocido es el agar nutritivo o agar común, resultante de la adición de agar al caldo nutritivo.

2.2. *Medios de enriquecimiento*: Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes o fastidiosos. Este enriquecimiento se hace por agregado de por ejemplo: sangre, leche, bilis, huevo, et.

2.3. *Medios selectivos*: Son aquellos utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el desarrollo de otras, ya que poseen una sustancia inhibitoria. Ejemplo: el agar Mac Conkey posee sales biliares y cristal violeta que inhiben las bacterias gram positivas.

2.4. *Medios diferenciales*: Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. Contienen compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquieren coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada.

Ejemplo: el agar EMB tiene eosina y azul de metileno que nos permite diferenciar *Escherichia coli* la cual forma colonias verdes (con brillo metálico a la luz reflejada), de otras enterobacterias que forman colonias de color rosa salmón.

2.5. *Medios de identificación*: Son aquellos que se utilizan para poner en evidencia alguna cualidad bioquímica que nos permite reconocer la identidad de un microorganismo.

Ejemplo: el Agar Kligler que permite determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico, con producción o no de gas, junto con la posible producción de ácido

sulfhídrico.

2.6. *Medios de conservación*: Se utilizan para conservar una cepa microbiana.

2.7. *Medios de transporte*: Se usan por ejemplo para el transporte de muestras clínicas e hisopos que fueron utilizados en el control de superficies que no pueden sembrarse inmediatamente.

Ejemplo: medio Cary Blair el cual es especialmente útil para la búsqueda de *Vibrio* spp. a partir de muestras rectales.

3. Según su composición:

Según su composición los medios de cultivo pueden ser complejos o indefinidos, sintéticos o definidos, o semisintéticos:

3.1. *Medios complejos o indefinidos*: Son aquellos cuya composición química exacta se desconoce ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales complejos. Son medios muy ricos nutricionalmente aunque indefinidos químicamente.

Ejemplo: digeridos de extracto de carne o extracto de levadura.

3.2. *Medios sintéticos o definidos*: Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.

3.3. *Medios semisintéticos*: Es una mezcla de los medios anteriores. Llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinidas.

4. Según su origen:

Según su origen los medios de cultivo pueden clasificarse en naturales, sintéticos o semisintéticos

4.1. *Naturales*: Son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal.

Ejemplo: extracto de tejidos o infusiones cuya composición química no se conoce exactamente.

4.2. *Sintéticos*: Son los que contienen una composición química cuali y cuantitativamente definida. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.

4.3. *Semisintéticos*: Son los medios sintéticos a los cuales se les agregan factores de crecimiento bajo una forma de extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

Presentación del medio de cultivo deshidratado:

Los medios de cultivo por lo general son mezclas de polvos, como lo son cada uno de sus ingredientes. Pero también existen algunos medios de cultivo deshidratados que se elaboran como granulados. Algunos recomiendan el uso de medios de cultivo granulados ya que ofrecen ciertas ventajas, según sus fabricantes. Estas ventajas son:

- 1) la escasa liberación de partículas (polvo) durante la manipulación, reduce la respiración de sustancias tóxicas.
- 2) la mayor fluidez del producto impide su adherencia a las paredes de los recipientes resultando más fácil la pesada.
- 3) se humectan fácilmente acelerando el proceso de suspensión o disolución no formándose grumos difícilmente solubles.
- 4) cuando el almacenamiento del medio de cultivo deshidratado es prolongado, la distribución física de los componentes se ve facilitada.
- 5) la conservación del medio se ve favorecida por el escaso contenido de humedad.

Recepción:

Durante la recepción de los medios de cultivo en el laboratorio, tener especial precaución en:

- a) Registrar en cada envase la fecha de ingreso al laboratorio (día, mes y año).
- b) Registrar en cada envase el número previamente asignado en el laboratorio.
- c) Archivar el Certificado de Análisis del medio recepcionado, verificando que el mismo coincida con el nombre del medio de cultivo y con el número de lote ingresado.
- d) Almacenar el o los envases de acuerdo a las recomendaciones del Fabricante que figuran en la etiqueta del envase o en el Certificado de análisis o en la Hoja de Seguridad.
- e) Dentro de lo posible, conservar los envases en lugar seco, protegidos de la luz, a una temperatura entre 15 y 25 °C. Los envases deben estar siempre bien cerrados.

La etiqueta del envase indica la fecha de vencimiento del mismo.

Preparación:

Los medios de cultivo se pueden preparar a partir de los componentes primarios, o pueden adquirirse deshidratados o listos para usar.

A continuación se enumeran algunas precauciones que deben tenerse en cuenta durante la elaboración de los medios:

- La balanza a utilizar en la pesada del medio deshidratado o de sus ingredientes debe estar calibrada en frecuencia establecida en un Plan Maestro de Calibraciones del Laboratorio.
- Los recipientes a utilizar en la preparación y envasado de los medios deben estar limpios, ya que residuos de detergentes o restos de otras sustancias que se hallen por lavado deficiente, puede causar efecto inhibitorio en la capacidad de crecimiento de los microorganismos.
- Los recipientes destinados a la preparación de medios de cultivo deben ser lo suficientemente grandes para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad, y los destinados al envasado para que durante la esterilización por autoclave no haya derrame de medios de cultivo o rotura de frascos.
- Las espátulas, cucharas y agitadores utilizados para la elaboración del medio deben estar limpios.
- El agua para disolución de los medios debe ser Agua Purificada o Destilada.
- Cuando el envase de medio de cultivo se abre por primera vez deberá anotarse, cerca de la fecha de ingreso, la fecha de apertura (día, mes y año).
- Para la selección del envase a abrir usar el concepto FIFO (*First In First Out* = primero en entrar primero en salir) y el concepto FEFO (*First Expiry First Out* = primero en vencer primero en salir).
- Verificar que el medio de cultivo no se encuentra vencido. En caso que esto suceda, descartarlo y utilizar otro envase.
- Agitar el envase para favorecer la mezcla de sus componentes.
- Pesar exactamente la cantidad deseada de acuerdo al volumen total a preparar, siguiendo las indicaciones descriptas en la etiqueta del envase.
- Extraer de la impresora el registro de la pesada y pegarlo en el *Notebook* correspondiente.
- Cerrar herméticamente el envase del medio de cultivo pesado (para evitar absorción de humedad, oxidación y/o contaminación) y guardarlo en su correspondiente lugar de almacenamiento.
- Rehidratar con el volumen correcto de agua. Para ello, primero es conveniente agregar aproximadamente la mitad de la cantidad de agua necesaria y agitar suficientemente para conseguir una suspensión homogénea; luego incorporar la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto las partículas de medio de cultivo que hubieran quedado adheridas a la pared.
- En caso que aplique, fraccionar en los recipientes correspondientes. Si se usa un dispensador automático,

el mismo debe estar calibrado en frecuencia establecida en un Plan Maestro de Calibraciones del Laboratorio.

- Calentar el medio cuando es indicado por el fabricante. Por lo general los medios líquidos pueden necesitar calentamiento sólo cuando es necesario disolver completamente; y los medios agarizados necesitan calentar hasta ebullición.
- Medir el pH (Ver Metodología aparte) antes de su esterilización y ajustarlo en caso de ser necesario. Registrar el valor obtenido.
- Tapar y etiquetar cada recipiente con el nombre del medio de cultivo, número de ciclo en el cual se esterilizará y fecha de vencimiento.

Metodología para la medición del pH:

Si bien cuando se utiliza agua neutra para su preparación los medios de cultivo muestran un valor correcto de pH, se recomienda comprobar el mismo y proceder su corrección en caso necesario. Para la toma del pH se recomienda usar un peachímetro.

El pH a cumplir que indica el fabricante del medio de cultivo, es el pH una vez que el medio ha sido esterilizado. El mismo depende del tratamiento de esterilización o de calentamiento a que haya sido sometido el medio de cultivo.

Para asegurar un pH final correcto, es necesario tomar el valor de pH antes de la esterilización, y en caso necesario ajustarlo añadiendo cantidad suficiente de NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N, o lo que indique el fabricante del medio de cultivo deshidratado..

Etiquetado:

Cada recipiente de medio de cultivo elaborado en el laboratorio debe etiquetarse con los siguientes datos:

- Nombre o abreviatura del medio de cultivo.
- Identificación del *batch* de medio elaborado
- Fecha de vencimiento.

Esterilización:

Todos los medios de cultivo que lo requieren deben ser esterilizados el mismo día de la preparación y preferentemente dentro de las dos horas.

Deben seguirse las recomendaciones del fabricante, típicamente se usa 121 °C durante 15 minutos, utilizando un autoclave calificado y ciclos validados. Sin embargo algunos medios de cultivo pueden requerir esterilización por vapor fluente o a temperaturas menores como 115°C para evitar el deterioro de componentes lábiles al calor. Algunos medios líquidos pueden esterilizarse por filtración.

Respecto a la validación de los ciclos de esterilización, para garantizar la correcta distribución de calor, hay varias recomendaciones teniendo en cuenta la carga dentro de la cámara del autoclave:

- Si existen variaciones en el tamaño de la carga, deben ser identificadas cargas mínimas y máximas.
- Antes de comenzar con los estudios de penetración de calor, deben ser establecidas las configuraciones de cargas máximas y mínimas.
- Las configuraciones de las cargas deben ser documentadas y sólo cargas autorizadas deben ser usadas.

En los ciclos de esterilización en los cuales se tarda mucho en alcanzar la temperatura deseada puede ocasionar sobrecalentamiento con el consiguiente deterioro del medio de cultivo: reducción en la capacidad de crecimiento o selectividad de los microorganismos, cambio de color, pérdida de claridad, alteración de agar, cambio de pH, etc.

Almacenamiento:

El almacenamiento de los medios de cultivo preparados debe realizarse siguiendo las indicaciones del fabricante. Por ejemplo, algunos se almacenan a temperatura ambiente, otros refrigerados (principalmente aquellos que contienen sangre, yema de huevo, telurito, etc.), o al abrigo de la luz, o en ambiente con humedad controlada, etc.

Siempre se debe asegurar, mediante *datalogger* u otra forma de registro, que el lugar de almacenamiento se encuentre dentro del rango de temperatura establecido.

Respecto a la fecha de vencimiento de los medios de cultivo esterilizados se deben seguir las recomendaciones del fabricante. Si el fabricante no establece el período de vigencia, éste debe ser establecido en el laboratorio después de su validación, como se verá más adelante.

Control de esterilidad:

Se recomienda preincubar una muestra de los medios de cultivo o una porción de sus envases, a 30-35 °C durante no menos de 3 días para asegurar la esterilidad del medio de cultivo elaborado.

Test de promoción de crecimiento:

Se debe controlar cada lote de medio de cultivo preparado para los ensayos microbiológicos, verificando que los medios presentan las propiedades adecuadas como se describe en la Tabla 1.

1) Para determinar las propiedades de fertilidad de un medio líquido:

Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.

Incubar no menos de 3 días a 30–35 °C para el caso de bacterias y no menos de 5 días a 20–25 °C para el caso de hongos y levaduras.

Se observa un crecimiento claramente visible del microorganismo comparable con el obtenido con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

2) Para determinar las propiedades de fertilidad de un medio sólido:

Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.

Incubar no menos de 3 días a 30–35 °C para el caso de bacterias y no menos de 5 días a 20–25 °C para el caso de hongos y levaduras.

El crecimiento obtenido no debe diferir en un factor de 2 respecto del obtenido con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

3) Para determinar las propiedades de inhibición de un medio líquido o sólido:

Sembrar en una porción del medio como mínimo 100 UFC del microorganismo apropiado.

Incubar a la temperatura adecuada durante, como mínimo, el mayor tiempo de período especificado en el ensayo.

No se observa crecimiento del microorganismo de ensayo.

4) Para determinar las propiedades indicativas:

Sembrar en una porción del medio como máximo 100 UFC del microorganismo apropiado.

Incubar a la temperatura especificada durante, como mínimo, el menor tiempo de período especificado en el ensayo.

El aspecto y las reacciones bioquímicas indicadoras de las colonias son comparables con los de las obtenidas con un lote de medio previamente ensayado y aprobado.

Tabla 1. Propiedades de fertilidad, inhibición e indicativas del crecimiento en los medios

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

Documentación:

Es crucial la trazabilidad en la preparación de los medios de cultivo, por lo tanto se debe registrar toda la información posible:

- Fecha de preparación.
- Responsable de preparación.
- Marca comercial del medio de cultivo deshidratado.
- Lote y vencimiento del medio de cultivo deshidratado.
- Batch del lote preparado
- Peso teórico.
- Registro de la pesada.
- Balanza utilizada.

- Total del volumen a preparar.
- En caso de fraccionamiento posterior indicar el número de recipientes y el volumen fraccionado por recipiente.
- pH antes y después del ajuste (si lo hubo).
- pH después de la esterilización.
- Peachímetro utilizado.
- Identificación del ciclo de esterilización

Los registros de datos crudos deben ser legibles e indelebles.

No deben completarse con lápiz.

Todos estos datos deben documentarse en un *Notebook*. El mismo debe ser revisado por una segunda persona siguiendo el principio del doble control: una segunda persona controla y firma que los datos ingresados y los cálculos realizados sean los correctos.

Las hojas del *Notebook* deben estar correctamente numeradas y debe constar el número total de las mismas.

Si se usan hojas de análisis preimpresas provenientes de un sistema informático deberán estar compiladas, numeradas con el formato 1 de n páginas.

Validación de la fecha de vencimiento:

La fecha de vencimiento y las condiciones de almacenamiento deben ser validadas.

El laboratorio debe crear un protocolo que incluya los siguientes test: pH, apariencia, esterilidad y test de promoción de crecimiento a ser llevados a cabo al menos en tres lotes de cada medio de cultivo al cabo de la fecha de vencimiento establecida.

Otra manera de asegurar que el tiempo fijado como vigencia es correcto, es efectuar el control de calidad del medio de cultivo nuevo recientemente elaborado, en paralelo con el anterior que está en uso. De esa manera se puede asegurar que todos los ensayos realizados con el medio anterior, se han efectuado con un medio que cumple con los criterios de calidad establecidos.

Bibliografía consultada:

1. *Quality Control Systems for the Microbiology Laboratory: The Key to Successful Inspections*. Lucía Clontz.
2. *Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements*. Lucía Clontz.
3. U.S Pharmacopeia. USP 36. Chapter <1117> *Microbiological Best Laboratory Practices*”
4. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist (AOAC) – 12th. Edition.
5. PDA Technical Report N° 1 – *Validation of Moist Heat Sterilization Processes – Revised 2007 - Sterilization Process Development - Cycle Development - Liquid Load Development- Liquid Load Patterns*”.
6. *Validation of Steam Sterilization in Autoclaves* (De Santis and Rudo) - Loaded-chamber heat penetration studies – Load cool point.
7. DRAFT 13 (2002) - PDA – *Industrial Moist Heat Sterilization in Autoclaves - Sterilization Cycles Development -Load Definition*.
8. ISO 11133 - *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*.

Equipamiento: Calificación y Control

Graciela Torno

- *Introducción*
- *Proceso de calificación de equipos analíticos*
 1. *Calificación del diseño*
 2. *Calificación de la instalación*
 3. *Calificación de la operación*
 4. *Calificación del desempeño.*
- *Proceso de recalificación de equipos analíticos*
- *Documentación*
- *Bibliografía*

Introducción

En el laboratorio contamos con una gran variedad de equipos y sistemas analíticos computarizados, desde simples centrífugas hasta tecnologías complejas, utilizados en procedimientos que finalmente nos ayudan a emitir datos que garantizan que los productos son aptos para el uso previsto.

La calificación de equipos analíticos carece en la actualidad de guías o procedimientos específicos. Existen opiniones encontradas en lo que se refiere a este tema. En este capítulo vamos a dar un enfoque científico de la calificación de equipos analíticos y la consideraremos como uno de los componentes principales requeridos para obtener resultados confiables y repetibles.

Cual es la diferencia entre validación y calificación?

El término validación se utiliza para procesos de fabricación, procedimientos analíticos y de software; y el término calificación se emplea para equipos. Por lo tanto la frase calificación de equipos analíticos se usa para el proceso de garantizar que un equipo es adecuado para el uso al que está destinado.

Componentes de la calidad de los resultados analíticos

Existen cuatro componentes críticos involucrados en la generación de resultados analíticos confiables y repetibles. La calificación de equipos analíticos constituye la base para esta generación. Los otros componentes esenciales son: la validación del método analítico, las pruebas de aptitud del sistema y las muestras control.

A continuación describimos someramente cada uno de estos componentes.

(a) Calificación de equipos analíticos: Es el conjunto de pruebas documentadas utilizadas para corroborar que un equipo se desempeña adecuadamente para el uso previsto. Este es el punto que profundizaremos en este capítulo.

(b) Validación del método analítico: Es el conjunto de pruebas documentadas para corroborar que un

procedimiento analítico es apto para el uso previsto.

(c) **Pruebas de aptitud del sistema:** Verifican que el sistema se desempeña de acuerdo con los criterios fijados en el procedimiento. Estas pruebas son utilizadas generalmente en cromatografía.

(d) **Muestras control:** Algunos análisis requieren también la inclusión de muestras control que brinden un aseguramiento continuo o durante el proceso de desempeño adecuado de la prueba.

Resumiendo, la calificación del instrumental analítico y la validación del método empleado contribuyen a la calidad del análisis antes de que los analistas lleven a cabo las pruebas. Las pruebas de aptitud del sistema y los análisis de muestras control ayudan a garantizar la calidad de los resultados analíticos inmediatamente antes o durante el análisis de la muestra.

Proceso de calificación de equipos analíticos

La calificación de equipos no es un único proceso continuo, sino el resultado de varias actividades diferenciadas, las cuales se las agrupa en 4 fases ⁽¹⁾. Es importante finalizar la fase anterior antes de pasar a la siguiente.

Las cuatro fases son: Calificación de Diseño (DQ), Calificación de Instalación (IQ), Calificación de Operación (OQ) y Calificación de Desempeño (PQ).

Algunas actividades de la calificación de equipos cubren más de una fase de calificación y los analistas pueden efectuarlas durante más de una de estas fases. Sin embargo en general se precisa un orden específico para las actividades de calificación. (Ver Tabla 1).

Tabla 1: Tiempo de ejecución, aplicabilidad y actividades para cada fase de la calificación de equipos analíticos

Calificación de Diseño	Calificación de Instalación	Calificación de Operación	Calificación de Desempeño
<i>Momento de aplicabilidad</i>			
Antes de la adquisición de un nuevo modelo de equipo.	Durante la instalación de cada equipo, sea nuevo o existente sin calificar.	Después de la instalación o reparación importante del equipo.	Periódicamente a intervalos especificados para cada instrumento.
<i>Actividades</i>			
En general se realiza conjuntamente con el fabricante, ya que antes de la DQ es necesario tener los requerimientos del usuario para que el fabricante pueda diseñar el equipo.	Descripción.	Verificación de parámetros fijos.	Establecimiento de pautas para el mantenimiento preventivo y reparaciones.
	Entrega del equipo.	Verificación de almacenamiento de datos, copia de seguridad y archivo seguros.	Establecimiento de prácticas de operación, calibración, mantenimiento y control de cambios.
	Montaje e instalación de los servicios necesarios.		
	Verificación del entorno. Red y almacenamiento de datos.		
Es necesaria la garantía de disponibilidad de soporte adecuado por parte del fabricante o del representante.	Verificación de la instalación del equipo.	Pruebas de las funciones del equipo.	Controles de desempeño

Descripción de las fases de calificación:

1- Calificación de diseño (DQ)

Antes de comenzar la calificación de diseño, el usuario debe definir las especificaciones funcionales y operacionales del equipo y los criterios para la selección del proveedor. En base a los “requerimientos de usuario”, el fabricante podrá diseñar el equipo. La calificación de diseño (DQ) puede ser realizada no sólo por el que desarrolla o fabrica el instrumento, sino también por el usuario. Por lo general el fabricante es responsable del diseño robusto y de mantener la información que describe como está fabricado y probado el equipo analítico antes de despacharse a los usuarios. Normalmente este control del equipo en fábrica es presenciado por el usuario.

2- Calificación de la instalación (IQ)

La calificación de la instalación es el conjunto de actividades documentadas necesarias para establecer que un equipo se entrega como fue diseñado y especificado y se encuentra debidamente instalado en el entorno seleccionado, y que además este entorno es adecuado para dicho equipo. La IQ se aplica a un equipo nuevo o usado o a cualquier equipo existente que no haya sido calificado. Partes relevantes de la IQ se aplican también a un equipo que haya sido transportado o esté siendo reinstalado por alguna razón.

Las actividades y documentación asociadas a la IQ son las siguientes:

- (a) Descripción: Proporcionar la descripción del equipo o de las distintas partes del mismo, incluyendo el fabricante, modelo, número de serie y la versión de software. Utilizar planos y diagramas de flujo si es necesario.
- (b) Entrega del instrumento: Asegurar que el equipo, y otros accesorios que el proveedor tenga que entregar, estén de acuerdo a lo especificado en la orden de compra, y que no hayan sufrido ningún deterioro debido al traslado. Verificar la entrega de manuales y planos correspondientes al mismo.
- (c) Servicios/ instalaciones/ entorno: Verificar que el lugar donde será instalado el equipo cumpla satisfactoriamente con los requisitos ambientales solicitados por el fabricante. Verificar que los servicios se encuentren operando correctamente.
- (d) Montaje e instalación: El montaje del equipo debe ser realizado por el fabricante e ingeniería o personal interno calificado. Cualquier hecho anormal observado durante el montaje e instalación deberá ser documentado.
- (e) Almacenamiento de datos: Algunos sistemas analíticos incluyen sistemas computarizados o es necesario conectarlos a la red. En estos casos debe realizarse una calificación del sistema computarizado.
- (f) Verificación de la instalación: Efectuar los diagnósticos y controles iniciales del equipo después de la instalación.

3- Calificación de operación (OQ)

Si el equipo posee instrumentos que son fundamentales para su funcionamiento, deberán ser calibrados previamente a comenzar la calificación de operación. Por ejemplo, en un autoclave será necesario calibrar todos los instrumentos necesarios para medir o regular la presión y temperatura; antes de comenzar la calificación de operación del autoclave se calibrarán los presostatos, los manovacúómetros, los sensores de temperatura. A su vez, deberá verificarse que los instrumentos utilizados para las calibraciones y para la calificación del equipo, se encuentren calibrados.

Luego que la calificación de instalación ha sido aprobada, se pasa a la calificación de operación, la cual consta de una serie de actividades documentadas, necesarias para demostrar que el equipo funcionará de acuerdo a la especificación operativa en el entorno seleccionado.

La fase OQ puede constar de los siguientes parámetros:

- (a) Pruebas de funciones del equipo: Las funciones requeridas por el usuario deben probarse para verificar que el equipo funciona según lo previsto por el proveedor. Ejemplos: si se trata de un baño

termostático, en esta etapa podrá verificarse si todas las teclas cumplen su función, es decir si enciende el equipo, si al modificar la temperatura el equipo responde, si funcionan las alarmas, etc. Si se trata de una incubadora, se verificará el encendido, si aumenta la temperatura correctamente, si funcionan las alarmas, etc. En el caso de un autoclave se verificará su encendido, las alarmas, se incluirá al departamento de seguridad para que verifique los parámetros de seguridad, como las correspondientes válvulas, se realizarán corridas con sensores de temperatura externos (equipo calibrado) para verificar la distribución de temperatura en distintos puntos de la cámara, dependiendo del tamaño de la misma, etc. En el caso de una cabina de seguridad biológica o de flujo laminar, se deberán realizar controles de integridad de filtros, recuento de partículas y control de velocidad de flujo⁽²⁾.

(b) Almacenamiento de datos, copia de seguridad y archivos seguros: en caso que corresponda, se debe probar el manejo seguro de los datos y su almacenamiento.

(c) En esta etapa, debe efectuarse la redacción de los correspondientes procedimientos de uso, mantenimiento preventivo y control del equipo.

4- Calificación de desempeño (PQ)

Luego que la calificación de operación haya finalizado satisfactoriamente, se realiza la calificación de desempeño, la cual consta de una serie de actividades documentadas, necesarias para verificar que el equipo se desempeña de acuerdo a las especificaciones del usuario. Puede incluir los siguientes parámetros:

Controles de desempeño (PQ): Se establece una prueba o serie de pruebas, para verificar el desempeño aceptable del equipo para el uso previsto. Ejemplos:

a.1) La PQ de un baño termostático o una incubadora puede incluir la verificación de la temperatura en distintos puntos del mismo (dependiendo del tamaño del equipo), a las temperaturas de trabajo y durante un tiempo determinado, con la carga habitual o la carga máxima que soporte el equipo.

a.2) Si se trata de estufa de esterilización⁽³⁾, además de la verificación de la distribución de la temperatura durante un tiempo determinado, se deberán realizar los correspondientes controles con indicadores biológicos (*Bacillus subtilis*) en distintos puntos de la misma. Luego estos controles se incuban a $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 7 días. Al cabo de este período se debe observar el no crecimiento en los mismos. Durante la PQ de la estufa de esterilización deben realizarse ensayos de penetración del calor, colocando sensores de temperatura e indicadores biológicos dentro de los materiales a esterilizar.

a.3) La PQ de una estufa de despirogenización⁽³⁾⁽⁴⁾, además de la verificación de la distribución de la temperatura en distintos puntos de la misma, incluirá el control de eliminación de endotoxinas bacterianas. Este control consta en ubicar viales conteniendo una cantidad conocida de endotoxina bacteriana, realizar el ciclo de despirogenización correspondiente, retirar los viales y luego determinar la cantidad de endotoxinas bacterianas en cada vial, y el test cumple si la reducción de endotoxina ha sido por lo menos 3 log de la cantidad inicial.

a.4) La PQ de un autoclave⁽⁵⁾ incluirá la penetración de calor en los distintos ciclos que estén programados en la misma. En el caso que la carga no es constante realizar este control con la carga máxima, colocando los sensores de temperatura y verificando que la temperatura en estos puntos se mantiene dentro de especificación. Para la calificación inicial se realizan tres corridas por cada programa. También se deberán incluir los correspondientes controles con indicadores biológicos (*Geobacillus stearothermophilus*) los cuales normalmente se colocan en los mismos lugares que los sensores de temperatura. Estos indicadores biológicos deben estar ubicados en el centro del material, por ejemplo dentro de Erlenmeyers o entre la ropa. Si se trata de una carga de líquidos, el indicador biológico utilizado pueden ser ampollas conteniendo esporas las cuales son colocadas en medio del contenedor que contiene el líquido a ser esterilizado.

a.5) La PQ de un equipo volumétrico, por ejemplo un dilutor, incluirá el control de los distintos volúmenes que dispensa. Se puede controlar cada volumen dispensando el mismo diez veces, tomando la pesada en cada uno de estos controles y luego calculando un volumen promedio que tendrá que encontrarse dentro de cierta especificación con una determinada desviación estándar porcentual.

a.6) La PQ de una cabina de seguridad biológica o de un flujo laminar incluirá el control de aire (control pasivo y activo) y control microbiológico de superficies, que justifique que el procedimiento de limpieza y

desinfección que se utiliza es el adecuado.

La calificación de desempeño de equipos en uso puede incluir las calibraciones realizadas durante los últimos años, es decir una calificación retrospectiva.

En la calificación de desempeño, debe quedar claramente explicitada, la forma en que se realizará la calificación, los puntos a muestrear y la especificación para cada una de las pruebas. También en esta fase de la calificación deben estar ya en vigencia los procedimientos de uso, mantenimiento, control y calibración, ya que después de la aprobación de esta etapa el equipo estará en condiciones de ser utilizado.

Proceso de recalificación de equipos

La recalificación es la repetición de un proceso de calificación o una parte específica de éste, luego de haber realizado el correspondiente control de cambio. Se realiza una recalificación cuando se produce un cambio en la ubicación de un equipo, luego de una modificación o reparación importante del mismo, u otra actividad que pueda modificar el correcto funcionamiento del equipo.

Documentación

Los documentos obtenidos durante la calificación del equipo deben conservarse de manera accesible. El primer paso necesario para realizar una calificación es la redacción del plan de calificación, el cual debe incluir la siguiente información:

- Numeración del plan: si hay varios equipos en un laboratorio, se asignará a cada uno un número de plan de calificación.
- Datos de equipo: Nombre, marca, modelo, origen, número de serie, etc.
- Firmas del personal que ejecutará el plan, lo controlará, jefe o gerente del área de calidad con las respectivas fechas de las firmas.
- Plan de calificación de diseño, instalación, operación y desempeño. Estos planes incluyen en forma listada las distintas pruebas a realizar en cada fase, con su descripción, especificación, con una columna donde se registre si la prueba ha cumplido o no, y otra columna donde se registre la firma y fecha del que lo ha realizado. También es adecuado incorporar un espacio de observaciones para anotar algún detalle que no haya sido tomado en cuenta durante el plan y que ha tomado relevancia durante la ejecución de la calificación.
- Finalmente debe existir una frase de conclusión final que deje constancia que el equipo cumple o no cumple la calificación y cuál es la fecha a partir de la que el equipo puede ser colocado en uso. Finalmente deben dejarse espacios para las firmas del personal que ha realizado la calificación (puede estar incluido el fabricante o el representante), la persona que ha controlado y el responsable de la unidad de calidad.

Una vez que el plan de calificación ha sido redactado y firmado por todo el personal que estará involucrado, puede comenzarse su ejecución. Se completa a medida que se realizan las distintas pruebas. Una vez finalizada la calificación, se define que el equipo puede colocarse en uso a partir de una fecha determinada. Tener en cuenta, que no sólo debe estar la calificación finalizada, sino los procedimientos de uso, mantenimiento y control del equipo en vigencia, y el personal capacitado.

A partir de este momento, cualquier cambio, reparación o mantenimiento realizado sobre el equipo debe quedar documentado en la correspondiente bitácora. Los cambios deben ser evaluados por el responsable del laboratorio, ya que tendrá que considerar si es necesaria una recalificación del equipo.

En el laboratorio debe existir un listado de todos los equipos que se encuentran en el mismo. Dicho listado debe incluir la descripción del equipo, marca, modelo, número de serie, el número de procedimiento de uso y mantenimiento, el número de procedimiento de calibración y si es un equipo GMP relevante, por lo tanto exige calificación, y cuál es su frecuencia. Hay equipos que no exigen ser calificados, como por ejemplo un mezclador por vórtice.

Bibliografía:

1. USP Farmacopea 36. <1058> *Calificación de instrumentos analíticos*.
2. USP Farmacopea 36. <1116> *Evaluación microbiológica de cuartos limpios*.
3. PDA Technical Report N° 3. *Validation of Dry Heat Processes: used for Sterilization and Depyrogenation*. Parenteral Drug Association.
4. PDA Technical Report N° 7. *Depyrogenation*. Parenteral Drug Association.
5. PDA Technical Report N° 1. *Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control*. Parenteral Drug Association.
6. ISO 14644

Sección II. Preservación, Desinfección y Esterilización.

	página
Capítulo II.1. Desinfectantes y Desinfección de superficies y equipos Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves	40
Capítulo II.2. Esterilización Celina Horak y Nora Carbone	53
A. Esterilización por Calor húmedo Federico Kurt Lungwitz y Nora Carbone	59
B. Esterilización con Radiaciones ionizantes Celina Horak	81
C. Esterilización por Óxido de etileno Nora Carbone	97
D. Filtración esterilizante de fluidos Mino Covo	112
Capítulo II.3. Indicadores biológicos de esterilización Russ Nyberg	130
Capítulo II.4. Control de la Validación de un Proceso de Saneamiento José E. Martínez	141
Capítulo II.5. Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves	152

Desinfectantes y Desinfección de superficies y equipos

Miguel D'Aquino y Sergio A. Teves

- *Introducción*
- *Factores que inciden en el proceso de desinfección*
 1. *Efecto final deseado*
 2. *Tiempo de contacto*
 3. *Carga microbiana*
 4. *Tipo de microorganismos presentes*
 5. *Tipo de superficie a tratar*
 6. *Posible presencia de interferencias*
 7. *Preparación de las diluciones*
 8. *Temperatura del proceso*
- *Generación de resistencia a los desinfectantes*
- *Rotación de desinfectantes*
- *Agentes desinfectantes más utilizados*
- *Bibliografía*

Introducción

La contaminación microbiana en superficies industriales y nosocomiales ha sido siempre un problema grave que podría llevar contaminaciones de productos que en definitiva pueden terminar en procesos infecciosos en pacientes. Generalmente, estos problemas son reducidos al mínimo a través de programas de limpieza y desinfección (sanitización), utilizando varios compuestos químicos tales como el hipoclorito de sodio, el etanol, sales de amonio de cuaternario, y tensioactivos anfóteros entre otros. ^(1,2,3)

La eficacia de estos programas es influenciada por diversos factores que es necesario recordar y tener en cuenta.

Factores que inciden en el proceso de desinfección

Estos factores son: ^(4,5,6,7)

- Efecto final deseado
- Tiempo de contacto
- Carga microbiana
- Tipo de microorganismos presentes
- Tipo de superficie a tratar
- Posible presencia de interferencias
- Preparación de las diluciones
- Temperatura del proceso

A continuación vamos a analizar cada uno de ellos.

1- EFECTO FINAL DESEADO:

Cuando trabajamos con desinfectantes o mejor dicho con agentes antimicrobianos de uso externo, tenemos dos tipos de respuestas o efectos:

- a) Los microorganismos presentes, en contacto con agente aplicado, cesan su replicación (su número permanece constante), sin perder su viabilidad (sin morir). Es lo que llamamos efecto **BIOSTÁTICO** (**BACTERIOSTÁTICO**, **FUNGISTÁTICO**, **BIOSTÁTICO**)
- b) Los microorganismos presentes, al ponerse en contacto por cierto tiempo con el agente aplicado, pierden su viabilidad, con lo cual su número se reduce significativamente, es decir hay muerte microbiana. Esto es lo que llamamos efecto **BIOCIDA** (**BACTERICIDA**, **FUNGICIDA**, **VIRICIDA**).

Dentro de estos procesos de muerte microbiana podemos definir:

Desinfección: Eliminación de los agentes contaminantes presentes sobre una superficie inanimada. Se suele admitir como desinfección la destrucción del 99,999 % de los microorganismos presentes o una reducción de 5 logaritmos del número inicial de ellos.

Cuando hablamos de desinfección sobreentendemos que lo que deseamos es reducir el número de microorganismos presentes y por lo tanto debemos usar agentes **BIOCIDAS**.

Antisepsia: Es un proceso de desinfección aplicado sobre un ser vivo.

Esterilización: Es la destrucción de **todos** los microorganismos presentes en una superficie, convenientemente acondicionada para evitar su recontaminación y mantener su condición de estéril.

Sanitización: Es la reducción de microorganismos a niveles seguros, ésta liga al concepto de limpieza. Cuantitativamente se admite como umbral de acción de un sanitizante la destrucción del 99,9% (3 logaritmos) de la carga inicial.

La diferencia entre el efecto Biocida y el efecto Biostático puede verse en el Gráfico 1.

Gráfico 1. a) crecimiento microbiano; b) bacteriostasis (biostático); c) muerte microbiana (biocida)

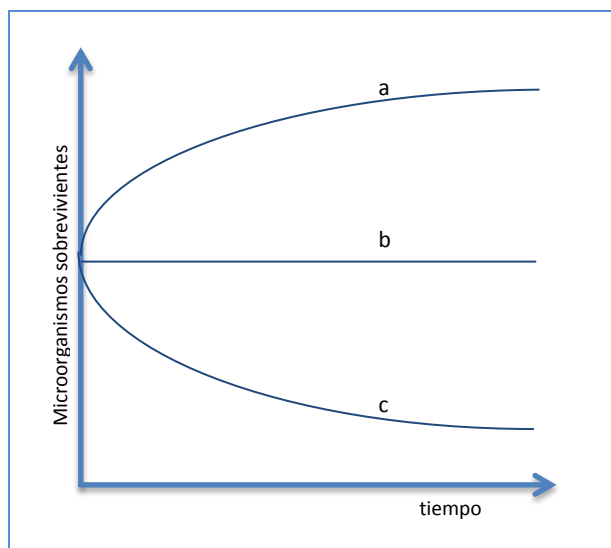
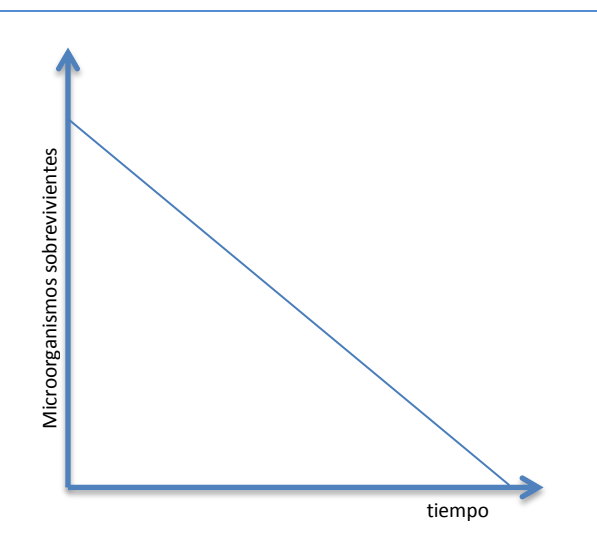


Gráfico 2. $\log N_s$ vs tiempo; tiempo de contacto.



2- TIEMPO DE CONTACTO:

La aproximación más común y más simple que se puede hacer a la cinética de muerte microbiana por acción de biocidas es aproximarla a una reacción de orden 1 en donde en cada punto de la curva de muerte, la velocidad depende de la concentración de uno de los reactantes, obteniéndose una expresión del tipo:

$$\text{Log } N_s = \text{Log de } N_0 - K.T$$

donde N_s = número de microorganismos sobrevivientes
 N_0 = número inicial de microorganismos
 K = Constante de velocidad (depende del microorganismo, del agente empleado y de su concentración)
 T = Tiempo

Si graficamos $\text{Log } N_s$ vs tiempo nos da idealmente una recta como la del Gráfico 2

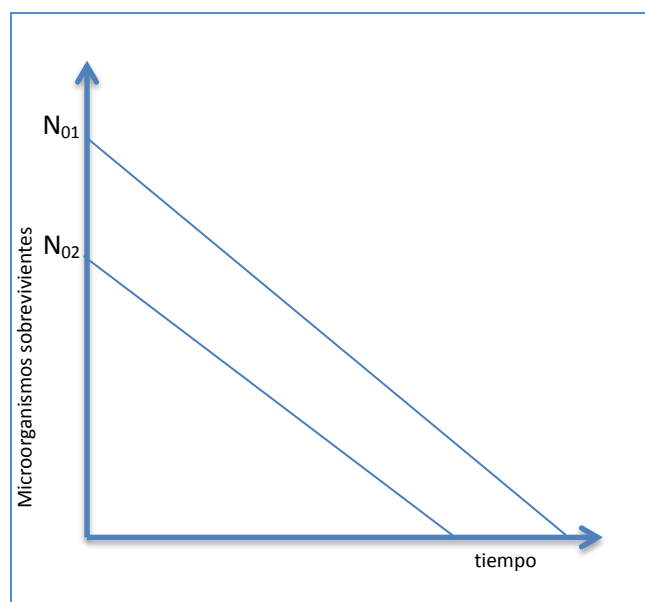
Más allá de la utilidad práctica de esta ecuación lo más importante de esta cinética es siempre tener en cuenta que EL PROCESO DE DESINFECCIÓN NO ES INSTANTANEO, requiere un tiempo mínimo para ser llevado a cabo satisfactoriamente.

3- CARGA MICROBIANA

El proceso no sólo no es instantáneo, sino que también depende de la población de microorganismos presentes, la cual representará el N_0 de la ecuación anterior, que nos permite ver muy gráficamente la diferencia de comportamiento de dos poblaciones iniciales. (Gráfico 3).

En el gráfico vemos que si bien ambas poblaciones tienen el mismo comportamiento (tienen la misma pendiente o velocidad de muerte), para ELIMINAR LA MAYOR POBLACION SE REQUERE MAYOR TIEMPO.

Gráfico 3. $\log N_s$ vs tiempo.



4- TIPOS DE MICROORGANISMOS PRESENTES

Es necesario recordar que diferentes microorganismos tienen diferente sensibilidad a un mismo agente. Esto se debe a la resistencia intrínseca (resistencia innata de un microorganismo) de cada grupo microbiano, la cual puede deberse a diferentes mecanismos.⁽⁸⁾

La Tabla 1 nos resume algunos ejemplos de resistencia intrínseca a desinfectantes

Esta diferencia de susceptibilidad nos permite ordenar a los diferentes grupos microbianos según su resistencia:

Esporas bacterianas	>	Micobacterias	>	Virus pequeños no lipídicos	>	Hongos	>	Bacterias (Formas vegetativas)	>	Virus medianos lipídicos

Tabla 1. RESISTENCIA INTRINSECA

Tipo de Resistencia		Ejemplo	Mecanismo
Impermeabilidad	Gram negativos	Triclosán Amonios cuaternarios	La membrana externa representa una barrera que impide el ingreso del agente
	Micobacterias	Amonios cuaternarios Clorhexidina	La pared de composición compleja y cerosa (altamente hidrofóbica) impide la entrada
	Esporas	Amonios cuaternarios, Fenólicos, Clorhexidina	Las envolturas y la corteza de la espora impiden el ingreso
	Gram positivos	Clorhexidina	Pared, presencia de mucopolisacáridos
Inactivación		Clorhexidina	Ruptura enzimática de la molécula

Esta diferencia entre especies es tan marcada y constante que se utiliza para clasificar a los agentes antimicrobianos en cuanto a su nivel de acción (alto, mediano o bajo). Esta clasificación puede observarse en la Tabla 2, donde los de nivel alto pueden destruir todas las formas microbianas, incluso llegando a destruir esporas, por lo cual pueden ser considerados AGENTES ESTERILIZANTES QUÍMICOS.

Tabla 2. CLASIFICACIÓN SEGÚN NIVEL DE ACCIÓN

NIVEL	ACTIVO FRENTE A :	COMPUESTOS
Alto	Esporas bacterianas Micobacterias Virus no lipídicos Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Glutaraldehído 2 % Formol 20 % Peróxido de hidrógeno Cloro (> 5000 ppm)
Medio	Micobacterias Virus no lipídicos Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Alcoholes Cloro (<5000 ppm) Yodóforos Clorhexidina Fenólicos
Bajo	Hongos y levaduras Formas vegetativas Virus lipídicos	Amonios cuaternarios Anfóteros Mercuriales

Es necesario destacar que un agente con un determinado nivel de acción no va a aumentar este nivel al incrementar su concentración; por ejemplo, un fenólico nunca va a llegar a ser de nivel alto, salvo que se lo combine con otro agente.

5- TIPOS DE SUPERFICIES

El tipo de superficie a tratar es un dato muy importante, ya que el agente y/o la forma de aplicación debe ser la

indicada para la superficie a tratar. Se deben evaluar ^(9,10, 11,12):

- *La posibilidad de adsorción del agente*: esto puede jugar de dos formas, una es la fijación a la superficie, pero manteniendo su actividad biocida sobre ella, lo cual puede favorecer su acción residual; la otra posibilidad es una muy fuerte adsorción que impida al agente ponerse en contacto con los microorganismos y por ende reducirá su acción.
- *Efectos corrosivos del agente sobre la superficie*: esta es una gran limitación de muy buenos agentes desinfectantes como los oxidantes que pueden dañar superficies metálicas
- *Contacto entre la superficie y el agente*: La solución del agente debe “mojar” completamente la superficie a tratar, si la superficie es demasiado hidrofóbica deberá usarse una formulación que reduzca la tensión superficial, para que el agente se distribuya en forma homogénea, y cubra perfectamente la superficie contaminada.
- *Presencia de humedad*: Tener en cuenta la posibilidad de dilución del agente en la humedad de la superficie. En este punto conviene recordar que uno de los requerimientos para el desarrollo microbiano es la humedad, por lo tanto una superficie que permanezca húmeda tiene más riesgo de contaminación que una superficie seca.

6- POSIBLE PRESENCIA DE INTERFERENTES

En la práctica de la desinfección casi siempre nos encontramos con superficies y/ o equipos que fueron usados y que puedan contener residuos, estos residuos deben eliminarse completamente antes de la etapa de desinfección, ya que generalmente reducen la acción de los agentes desinfectantes.

La Tabla 3 nos brinda un breve resumen de estas interacciones indeseables.

Tabla 3. INTERACCIONES INDESEABLES CON AGENTES DESINFECTANTES

TIPO DE INTERACCIÓN	MECANISMO
Fuerza iónica pH	Intervienen en el grado de disociación de la molécula activa.
Dureza	Puede formar quelatos con algunos compuestos. Estabiliza membranas.
Materia orgánica	Adsorción del desinfectante. Protección física del microorganismo. Reacción con el agente antimicrobiano. Formación de compuestos insolubles.
Compuestos aniónicos	Incompatibles con compuestos catiónicos.

En conclusión, siempre debemos tener presente que **NO SE DEBE DESINFECTAR SOBRE LO SUCIO**. Previamente a la desinfección siempre debe limpiarse la superficie, aún con formulaciones duales que “limpian y desinfectan” se debe tratar la superficie dos veces, la primera para remover la suciedad y la segunda para desinfectar. ^(7,8)

7- PREPARACION DE LAS DILUCIONES

a) Efecto de la concentración.

La dilución del producto esta relacionada directamente a la concentración del agente activo, esta concentración a su vez se relaciona directamente con la eficiencia o con la energía del proceso de desinfección. Cuando decimos eficiencia, nos referimos tanto al nivel de destrucción microbiana (porcentaje de destrucción de la carga inicial), como al tiempo requerido para completar el proceso.

Concentración y Tiempo de desinfección se relacionan según la siguiente expresión:

$$C^{\eta}_1 \times T_1 = C^{\eta}_2 \times T_2$$

Donde : C = concentración

T = tiempo

$$\eta = \text{Coeficiente de concentración} = \frac{\log T_2 / \log T_1}{\log C_1 / \log C_2}$$

Este último parámetro, COEFICIENTE DE CONCENTRACIÓN, adquiere una gran importancia práctica ya que nos indica como va a comportarse un desinfectante cuando está diluido. Intuitivamente estamos tentados a pensar que si disminuimos la concentración del agente desinfectante a la mitad, necesitaríamos el doble de tiempo para tener la misma eficiencia de proceso; lo cual no es estrictamente cierto, dado que el tiempo depende de η el cual es una constante para cada producto. En la tabla 4 a través de varios ejemplos veremos como influye este parámetro.

Tabla 4 : EFECTO DE LA DILUCION EN EL TIEMPO DE ACCION DE UN DESINFECTANTE (INFLUENCIA DEL COEFICIENTE DE DILUCION)

Exponente η	Ejemplo	Aumento del tiempo de acción al diluir al 1/2	Aumento del tiempo de acción al diluir al 1/3
1	Mercuriales - Cetrimide	2	3
2	Clorobutanol	4	9
3,1	Etanol	9	30
5,8	Fenol	55	585
8	Cresol	256	6561

Según surge de la Tabla 4, en el caso de agentes como el Cetrimide con $\eta=1$, una dilución a la mitad se compensa con un aumento al doble del tiempo de contacto; pero en casos como el de los agentes fenólicos, en que $\eta > 5$, la dilución al medio aumenta tanto el tiempo necesario, que estamos hablando de una neutralización del agente por dilución. Es en este tipo de compuestos con η altos en donde el control de la dilución es crítico ya que pequeñas diferencias de concentración se traducen en grandes diferencias de eficiencia.

b) *Uso de agua y recipientes estériles o pasteurizados:*

El agua utilizada para llevar el producto a la dilución de uso no debe aportar microorganismos, lo mismo que los recipientes utilizados

c) *Filtración esterilizante en caso e ser necesario:*

Esto es útil si no disponemos de agua de buena calidad microbiológica o en el caso de los alcoholes, que si bien es imposible que proliferen bacterias en ellos, pueden vehicular esporas bacterianas viables, ya se comportan como esporostáticos.

d) *Agua dura:*

El agua dura puede interferir con el agente, por lo que debe evitarse su uso de agua dura, dado que aporta cationes divalentes que pueden estabilizar membranas.

e) *Caducidad de las diluciones:*

Idealmente se deben emplear diluciones frescas, recientemente preparadas y descartar las mismas al final del día (preparadas en envases estériles o pasteurizados). Como esto en la práctica no siempre es posible, si se va a usar una dilución más de un día, se debe fijar un *Período de caducidad*. Este período va a ser variable en cada lugar y con cada agente, y dependerá de:

- Estabilidad del agente: algunos agentes como el hipoclorito de sodio pierden título con el tiempo.
- Interacciones con el envase: tanto las paredes como las tapas de los envases pueden adsorber agente activo y así disminuir su concentración efectiva en solución.
- Posibilidad de contaminación microbiana de las soluciones diluidas listas para el uso.

Para estimar el período de caducidad se deberán efectuar estudios que la soporten como ser:

- Medición de la concentración del agente activo.
- Evaluar la aparición de microorganismos contaminantes
- Seguir la actividad biológica (efectividad).

8- TEMPERATURA

Un aumento de la temperatura en desinfección química siempre favorece la acción del desinfectante disminuyendo los tiempos de contacto y aumentando por ende la eficiencia. En procesos de desinfección por calor la temperatura es una medida directa de la energía empleada en el proceso.

Si bien estos son los factores fundamentales que condicionan el proceso de desinfección, hay otros temas de importancia que debemos ver antes de dar un repaso de los principales agentes desinfectantes disponibles.

Tabla 5 : MECANISMOS Y BLANCOS DE ACCIÓN DE AGENTES DESINFECTANTES

BLANCO	AGENTE	MECANISMO
Pared Celular	Glutaraldehído	Entrecruzamientos en proteínas
	EDTA	Remoción de cationes divalentes, liberación de LPS
Membrana citoplasmática	Amonios cuaternarios	Daño general afectando los fosfolípidos de la bicapa
	Clorhexidina, biguanidos poliméricos	Afectan integridad de la membrana celular con aumento a de la permeabilidad, pérdida de Potasio, aminoácidos y macromoléculas, desacople y coagulación citoplasmática (a altas concentraciones)
Macromoléculas	Formol	Entrecruzamientos entre cadenas de DNA, RNA y Proteínas
	Glutaraldehído	
ADN	Acridinas y colorantes básicos	Intercalamiento entre dos bases de la cadena.
	Halógenos, Peróxidos, Ag	Ruptura de hebras e inhibición de síntesis
Grupo Tiol	Metales pesados	Unión al grupo tiol de proteínas unidas a membranas y pérdida de actividad biológica
Oxidantes	Halógenos, peróxidos	Oxidación de grupos funcionales de macromoléculas (SH, SO, SS, Formación de radicales OH*).

Generación de resistencia a los desinfectantes

La resistencia puede ser consecuencia de diferentes “estrategias” microbianas, que pueden darse en forma inducible o permanente:

- 1- Alteración de los blancos moleculares (modificaciones de las moléculas blanco)
- 2- Inactivación de agentes por reacciones covalentes (ejemplo, Agentes oxidantes con mucílagos producidos por el germen), o enzimáticas (Formaldehído reductasa)
- 3-Formación de Biopelículas (biofilm)
- 4-Disminución del agente en el sitio de acción ya sea por expresión de Bombas de Eflujo (clorhexidina/ amonio cuaternarios), o alteración de estructuras de la membrana externa como la disminución de porinas.

Cualquiera de estos eventos resultará en un aumento de la resistencia al agente antimicrobiano. Algunos genes responsables de estas respuestas han sido caracterizados, pudiendo ser de localización cromosomal o plasmídica.

En líneas generales este aumento de la resistencia a desinfectantes se observa como un aumento o corrimiento en la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), pero siempre este aumento es menor que el de las concentraciones de uso (sólo en soluciones diluidas).

En el caso de la industria farmacéutica, dada la baja carga microbiana y el tipo de proceso (concentración adecuada del agente, por tiempos cortos con posterior enjuague), hay escasas posibilidades de una presión selectiva que determine un aumento de la resistencia de los microorganismos contaminantes.

Particularmente una situación común en ciertos sistemas (como ser los sistemas de distribución de agua, con limpieza deficiente y restos de humedad), donde se generan biopelículas, estas aumentan hasta 100 veces la resistencia y para su remoción requieren tratamiento enzimático y/o acción mecánica.

Tabla 6. ALGUNOS MICROORGANISMOS HALLADOS EN DESINFECTANTES

Producto	Microorganismo	Recuento (UFC/mL)
Dx Institucional (Quat)	<i>Escherichia coli</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.0 X 10 ⁵
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	6.3 X 10 ⁴
Dx Quirúrgico (Quat)	<i>Salmonella sp</i>	ND
Dx Iodado (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	ND
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	180
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i> - <i>Alcaligenes fecalis</i>	2.8 X 10 ⁴
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	3.4 X 10 ⁴
Dx Institucional (Quat)	<i>Burkholderia cepacia</i>	500
Dx Institucional (Quat)	<i>Citrobacter freundii</i>	480

En nuestra experiencia hemos observado contaminación de soluciones desinfectantes, las cuales en su mayoría eran soluciones acuosas de amonios cuaternarios de hasta 1500 ppm (mg/L), y en cuanto a los microorganismos contaminantes (Ver agentes en tabla 6), demostraron **alta dependencia de sustrato**, que se evidenció en los siguientes hechos:

- El microorganismo aislado perdía rápidamente su resistencia, aún después de un solo repique (aislamiento primario). De hecho en muchos casos para demostrar la resistencia del mismo hubo que usar la solución contaminada como inóculo.
- Alta viabilidad en el producto desinfectante contaminado, algunos por más de 10 años.
- En un caso particular inclusive el microorganismo no desarrollaba en ausencia del agente.

Como surge de la Tabla 6, el principal agente que hemos aislado en nuestro medio fue *Burkholderia cepacia*, entre otros gram negativos y a veces no sólo se detectó su presencia, sino se que pudo cuantificar llegando a recuentos mayores a 1×10^4 .

Esto nos recuerda lo visto líneas arriba en cuanto al **cuidado en la preparación de diluciones de uso de los desinfectantes** y lo crítico que resulta este punto.

ROTACION DE LOS DESINFECTANTES

¿Por qué rotar?

En primer lugar **para cumplir con las directivas vigentes en GMP**. Estas toman directivas de la FDA, que se basan en la suposición de que los desinfectantes se comportan como los antibióticos, en el hecho que generan resistencia con el tiempo.

Esto es cierto para los Antibióticos, pero **No existe evidencia que ocurra para desinfectantes en las condiciones de uso**. Esto es así porque el proceso de desinfección es muy enérgico (cuando esta bien realizado) y no deja una población de supervivientes lo suficientemente alta como para que se establezca una población resistente.

O sea, la probabilidad de que la flora contaminante de una superficie se vuelva resistente al proceso de desinfección, si éste es adecuado, es muy baja si es que existe.

Los estudios que demuestran adaptación microbiana a desinfectantes están realizados estudiando el comportamiento de los microorganismos frente a concentraciones de agente muy inferiores a las que se usan en la práctica y esa adaptación, fenotípicamente se evidencia en el corrimiento de la Concentración Inhibitoria Mínima, que es inferior a la concentración bactericida.

Lo que sí existen son errores de aplicación y la contaminación de las soluciones diluidas de los desinfectantes. De hecho, de nuestra experiencia todas las contaminaciones de equipos en planta fueron secundarias a fallas en el proceso de lavado previo a la sanitización y/o al diseño de los equipos que dificultaba el lavado, con lo cual la desinfección perdía efectividad debido a la suciedad acumulada y a la comunidad microbiana desarrollada en la misma.

Si bien muchos autores apoyan la idea de que si un desinfectante funciona bien no debería ser cambiado, debido a las normativas vigentes y a una posible contingencia, es necesario tener más de un desinfectante disponible entre nuestras herramientas.

AGENTES DESINFECTANTES MAS UTILIZADOS (13,8,10,16,5,6)

1- ALCOHOLES

Los alcoholes mas usados son el etanol y el isopropanol, ambos se usan al 70 % dado que a esa concentración expresan su mayor poder desinfectante.

Ejercen su acción dañando membranas celulares y desestabilizando proteínas.

El espectro de acción de estos agentes es **intermedio**, No son esporicidas, pero son esporostáticos. En cuanto a las diferencias entre ellos, el Isopropanol tiene más acción bactericida y el etanol más acción virucida.

Presentan sinergia con otros agentes, como amonios cuaternarios, biguánidos, álcalis y ácidos. Son muy usados en antisepsia y desinfección, conservación y limpieza, en este último caso utilizado luego del enjuague favorece y acelera el secado.

Si analizamos su toxicidad, estos agentes son irritantes, volátiles e inflamables.

2- ALDEHIDOS

a) Formaldehído:

Fue y es ampliamente utilizado. Su acción se ejerce por alquilación de grupos C=O, SH, -OH, NH₂ de proteínas y/o de ácidos nucleicos.

Es un agente de alto nivel, por lo cual tiene acción esporicida y puede considerarse un esterilizante químico.

Su espectro de uso es amplio, desde su uso como agente esterilizante en una concentración al 20% y por un tiempo de varias horas; desinfección de alto nivel (20 minutos), desinfectante de superficies (8%), desinfección de ambientes (5g/ m³ / 4 hs) (aplicable a la desinfección de cabinas de flujo laminar) o como conservador al 0,1 %. En cuanto a este último uso en nuestro medio esta prohibido en domisanitarios, pero su uso esta permitido en cosméticos que se utilizan con posterior enjuague.

Sus puntos negativos los da su patrón de toxicidad, dado que es irritante, hipersensibilizante, y fundamentalmente fue catalogado por la OMS como probablemente carcinógeno para el hombre. Cuando se usa para la desinfección de grandes áreas o equipos se deben usar los elementos de seguridad adecuados para evitar la exposición de la piel y su inhalación.

Cuando se usa para la desinfección ambiental en forma gaseosa (aire o cabinas de flujo laminar), el área a tratarse debe ser evacuada durante todo el tratamiento y antes de permitir el ingreso de personas, debe neutralizarse con vapores de amoníaco y/o ventilarse perfectamente.

Sus puntos favorables son su bajo costo, su disponibilidad en el mercado, su potencia y el hecho que la interferencia por dureza y materia orgánica es mínima.

b) Glutaraldehído:

Al igual que el agente anterior el Glutaraldehído ejerce su acción frente a diferentes grupos funcionales de macromoléculas, pero además al ser una molécula divalente (con dos grupos reactivos), tiene una fuerte unión a grupos amino de pared y membrana celular, e inhibe funciones como el transporte de electrones. Sus dos funciones aldehído tienen la distancia óptima para producir entrecruzamiento en la cadena de DNA.

Es un desinfectante de alto nivel. Su principal uso es como esterilizante químico al 2% y por un tiempo de contacto que va de 6 a 12 hs es muy usado como desinfectante de alto nivel (2%, 20 minutos de acción) y esta siendo usado como agente conservador en productos domisanitarios.

En cuanto a su toxicidad es menos tóxico que el formol pero en algunas personas puede producir hipersensibilidad.

A consecuencia de sus dos grupos reactivos, debe extremarse la limpieza previa, dado que puede fijar materia orgánica a las superficies tratadas.

3-HALOGENOS

En esta categoría ubicamos a agentes que generan cloro activo como: Hipoclorito de sodio, Dióxido de cloro, Dicloroisocianurato, Cloramina T, etc.

En todos los casos, dado que actúan a través del cloro activo, son productos oxidantes que ejercen su efecto oxidando grupos funcionales de macromoléculas. Son agentes de alto nivel, con una multiplicidad de usos:

- Desinfección de alto nivel a concentración equivalente de más de 5000 ppm (mg/L) de cloro
- Desinfección fuerte - 250-500 ppm
- Desinfección de superficies, sistemas de diálisis, lactarios, etc - 250 ppm
- Antiséptico, Sanitizante - 50 ppm
- Potabilizante de agua -0,2 a 0,5 ppm

Son agentes que se afectan poco por la dilución, no son afectados por la dureza del agua, pero son inactivados por materia orgánica y agentes reductores, tienen dependencia del pH y son inestables por encima de 50°C (más estables a temperatura ambiente, pero su concentración decae con el tiempo), pero el factor principal que limita su uso es que es corrosivo para superficies metálicas.

Si analizamos sus características toxicológicas, son agentes irritantes y se discute la importancia de los productos tóxicos que se forman al ser usados como potabilizantes de aguas naturales sin tratamiento previo.

Otra subcategoría dentro de los Halógenos son los agentes lodados, representado por las tinturas de lodo o mas comúnmente usados, lodóforos como la lodopovidona. Estos agentes también son de alto nivel, se usan ampliamente como antisépticos, incluso prequirúrgicos y en la desinfección de agua. También existen formulaciones para la desinfección de superficies industriales, fundamentalmente industrias agrícolas y de alimentos

4- ACIDO PERACETICO

Es una agente oxidante cuya función se ejerce por oxidación de grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos, y por desnaturalización proteica.

Es un potente agente de alto nivel, siendo esporicida en concentraciones de 0,3 %.

Al ser oxidante a su acción desinfectante se suma la acción desodorizante, por lo cual es ampliamente usado en la desinfección de objetos y superficies.

Presenta varias ventajas en su uso, la principal es que se degrada a compuestos inocuos como son el agua y el ácido acético, es poco afectado por la materia orgánica y la dureza, a concentraciones de uso resulta no tóxico ni irritante (salvo ojos).

Las soluciones concentradas deben manipularse con cuidado dado que estas penetran la piel produciendo quemaduras y los vapores emanados son sumamente irritantes.

5-PEROXIDO DE HIDROGENO

Es un elemento oxidante y como tal su acción se ejerce por oxidación de grupos funcionales de macromoléculas incluyendo C=C de lípidos; en fase gaseosa genera el radical libre OH*.

Es un agente de alto nivel, usado a concentraciones mayores al 10 % tiene acción esporicida, y al ser oxidante se le suma el efecto desodorizante.

Es ampliamente usado en la antisepsia y limpieza de heridas, desinfección de objetos y superficies y esterilización de material crítico.

La ventaja principal es que luego de ejercer la su acción se degrada a compuestos totalmente inocuos como lo son el oxígeno y el agua.

6-AGENTES FENÓLICOS

Son agentes de espectro de acción **intermedia**, más activos frente a gram positivos, con algo menos de actividad frente a Pseudomonas y hongos pero con fuerte acción frente a Micobacterias.

Su modo de acción consiste en producir un daño en la membrana, que aumenta la permeabilidad a los protones que produce un desacople de la fosforilación oxidativa; a concentraciones mayores a esta acción se le suma la coagulación de proteínas citoplasmáticas.

Se antagonizan con cationes divalentes (aguas duras) y medio alcalino, pero resisten la carga de materia

orgánica. Son sinérgicos con EDTA.

El agente tipo es el Fenol habitualmente usado a 5 %; su uso esta relegado por ser irritante y su olor penetrante.

Son más utilizados sus derivados: Hexaclorofeno, O-Fenilfenol, y Cloroxilenol; participan en la formulación de diversos jabones y antisépticos; el O-fenilfenol es el componente más utilizados de los desinfectantes de ambiente en aerosol.

Estos agentes también son agentes hipersensibilizantes, particularmente para los infantes.

Este grupo en general esta siendo regulado dado su toxicidad ambiental y su dificultosa biodegradación.

7-AMONIOS CUATERNARIOS.

Es el grupo que más se desarrolló en los últimos años siendo los más utilizados en diversas aplicaciones. Su acción se ejerce en varias etapas, la primera es la adsorción a la pared bacteriana, luego reacciona con la membrana plasmática conduciendo a su desorganización, con la consecuente pérdida de solutos de bajo peso molecular; la acción prosigue con degradación de macromoléculas y lisis celular.

Si bien son agentes de bajo nivel (pueden tener actividad esporostática y micobacteriostática), son agentes que poseen muy baja toxicidad y su molécula le confiere propiedades deterativas que ayudan el proceso de limpieza.

Su acción es antagonizada por materia orgánica, compuestos aniónicos, jabones, nitratos, Lecitina, ácido bórico y agua dura (cationes divalentes). Si actividad se sinergiza en formulaciones con EDTA, Alcoholes y Clorhexidina.

Entre los derivados más utilizados encontramos al Benzalconio, Benzetonio, Cetrimida, Lapirio y derivados de última generación que son mezclas de cuaternarios.

Entre las aplicaciones se encuentran la antisepsia preoperatoria, antisepsia de mucosas, antisepsia de manos, desinfección de superficies no críticas y la desodorización; el benzalconio es muy utilizado en los productos de higiene y desinfección domestica e institucional.

8- BIGUANIDOS

Su acción la ejercen en un primer paso sobre las envolturas celulares, dañando la funcionalidad de la membrana plasmática y luego penetra y coagula el citoplasma.

Son agentes de nivel medio con acción más reducida sobre *Pseudomonas* y *P. vulgaris*.

El agente tipo es la clorhexidina, si bien en el mercado hay derivados poliméricos más modernos como el PHMB (Poliexa metilen biguanido). La clorhexidina es muy usado en desinfección en general fundamentalmente en la desinfección de manos donde por su adsorción a la piel presenta acción residual.

Los derivados poliméricos son muy usados en desinfección en general, desinfección de natatorios y desinfección de superficies, aun las que se encuentran en contacto con alimentos dado a su escasa toxicidad.

Los biguanidos presenta acción a concentraciones de 200 mcg/ ml.

Su accionar se ve afectado por agentes aniónicos, no iónicos, carbonatos y además se adsorbe sobre gomas, alginatos, derivados de la celulosa y sólidos finamente divididos. Son sinérgicos con alcohol y cetrimida.

Bibliografía

1. *Antimicrobial activity on glass materials subject to disinfectant xerogel Coating*. G. J. Copello , S. Teves ,J. Degrossi, M. D'Aquino,M. F. Desimone, y L. E. Diaz. J. Ind Microbiol. Biotechnol. (2006) 33: 343–348.
2. *Proving the antimicrobial spectrum of an amphoteric surfactant-sol-gel coating: a food-borne pathogen study*, G. J. Copello , S. Teves, J. Degrossi, M. D'Aquino, M. F. Desimone , L. E. Daz.. J Ind Microbiol Biotechnol (2008) 35:1041–1046.
3. USP 36 <1072>. *Desinfectants and Antiseptics*.
4. *Sterilization Principles and Practice of Disinfection, Preservation & sterilization* Russell, Hugo & Ayliffe's. FOURTH EDITION. Blackwell Publishing .2004
5. *Pharmaceutical Microbiology*, Hugo and Russell, Seventh editions, Blackwell Science 2004.
6. *Desinfección, desinfectantes, limpieza*. Miguel D Àquino, Roberto Rezk, Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1995.
7. *Saneamiento, Higiene y Sanidad*. Editorial Marchi 1999.
8. *Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides*. D. Russell. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2003) **52**, 750–763.
9. APIC guidelines for selection and use of disinfectants, AJIC, Vol 24, Nro 4, pp 314-342, august 1996.
10. *Draft Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, William A. Rutala, Ph.D., M.P.H., David J. Weber, M.D., M.P.H., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee CDC cleared 2/11/2002/WAR corrected and returned to CDC 2/20/2002.
11. *Cosmetic Microbiology a Practical Approach*, Phillip A. Geiss. Second Edition, Taylor and Francis Group.2006.
12. CTFA Cleaning & Sanitization Guidelines. Draft 2001.
13. *Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and resistance* Gerald McDonnell and a. Denver Russell. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 1999, p. 147–179.
14. *Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disifენტants: an increasiling important area of investigation*. A. D. Russell. Journal of antimicrobial chemotherapy, (2002) 49, 597-599.
15. *Mechanisms of action of antibacterial biocide*. S.P. Denyer. International Biodeterioration y Biodegradation (1995) 227-245.
16. PROEF (Programa de Educación y Actualización Farmacéutica.) Tercer ciclo Modulo 3. “UD6 Actualización sobre el empleo de antisépticos y desinfectantes. D´Aquino Miguel, Teves Sergio, Degrossi Jose. Ed. Panamericana 2001.pp 151-178

Esterilización

Celina Horak y Nora Carbone

- *Generalidades*
- *Cinética de inactivación de microorganismos/Concepto de SAL*
- *Métodos de esterilización*
 - *Esterilización por agentes físicos*
 - *Esterilización por agentes químicos*
- *Consideraciones generales de la Validación de los procesos de esterilización*
- *Vida útil de los productos esterilizados*
- *Aplicación en productos médicos, incompatibilidades y limitaciones del método*
- *Bibliografía*

Generalidades

El objetivo de cualquier proceso de esterilización es destruir o eliminar todos los microorganismos presentes en/ó sobre un objeto o sustancia ^[1,2].

En los últimos años, las técnicas de esterilización han adquirido una importancia creciente debido a la variedad y cantidad de productos estériles requeridos. Por esta razón, cuando se planea fabricar productos médicos o medicamentos estériles debe considerarse una serie de elementos esenciales:

- a) Selección de materias primas y componentes o preparación del material de manera tal que la carga microbiana sea mínima (tipo y cantidad de contaminación microbiana a ser inactivada por el proceso de esterilización)
- b) Selección de material de envase que sea compatible con el proceso de esterilización.
- c) Aplicación de un tratamiento esterilizante adecuado que sea compatible con los productos y envases a esterilizar.
- d) Validación y control de rutina del proceso de esterilización.
- e) Almacenamiento y transporte adecuado de los productos estériles.
- f) Suministro, apertura y utilización de los productos estériles sin recontaminación.

La atención a cada uno de estos elementos esenciales proporcionará la seguridad máxima de que los productos presenten el menor riesgo posible al momento de usarlos.

La esterilización puede realizarse de 3 maneras:

- a. Por métodos destructivos;
- b. Por muerte o inactivación; y
- c. Por eliminación con medios físicos.

Los métodos destructivos son procesos muy violentos, que casi siempre implican calentamiento apreciable del material, o el uso de poderosos agentes oxidantes. Estos métodos, aunque son efectivos, están muy restringidos en su empleo porque pueden también afectar al material que se quiere esterilizar.

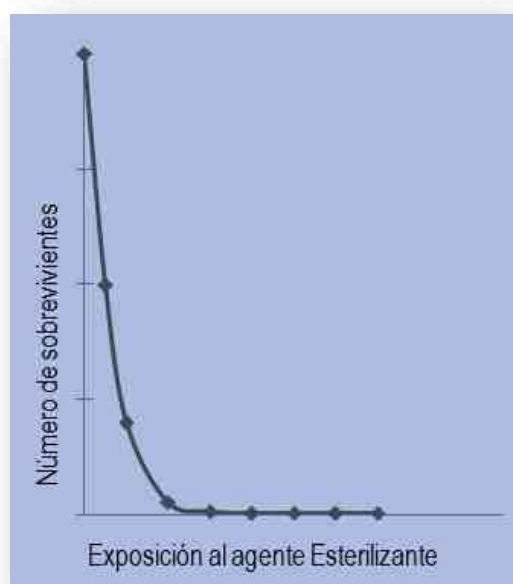
La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos.

La eliminación física por filtración está restringida a la esterilización de sustancias gaseosas o líquidas, y es llevada a cabo fundamentalmente por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

Cinética de inactivación de microorganismos

La esterilidad es definida como la ausencia de microorganismos viables, pero en la práctica es imposible demostrar que todos los microorganismos de un producto o lote de productos han sido inactivados o removidos.

Cuando una población de microorganismos es expuesta en forma constante a un agente esterilizante, hay una disminución progresiva de microorganismos que sigue una curva exponencial negativa que tiende a cero, pero nunca lo alcanza (Figura 1).



$$N = N_0 e^{-kT}$$

Donde:

N_0 : número inicial de microorganismos

T : exposición de agente esterilizante (puede ser dosis o tiempo)

N : número de organismos sobrevivientes a la T

k : constante de muerte, propia para cada tipo de organismo y condición del proceso.

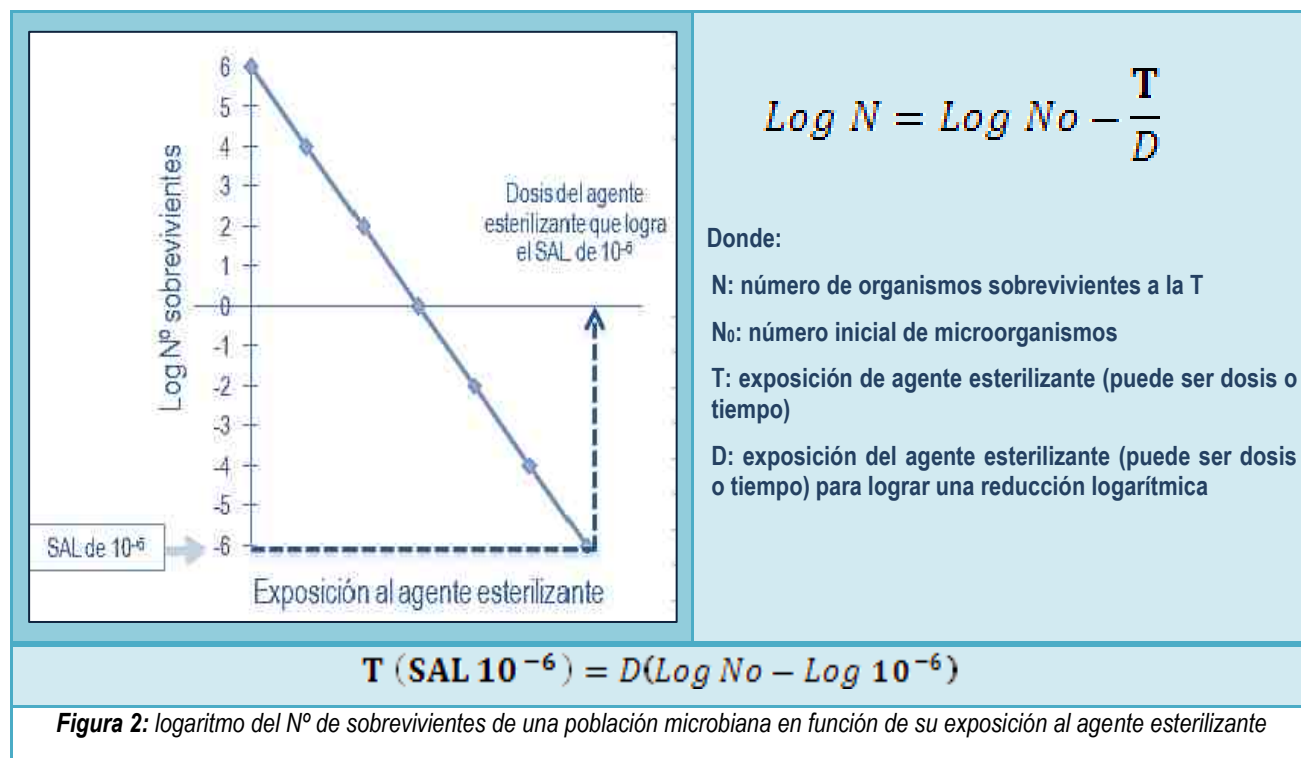
Figura 1: Curva de inactivación de una población microbiana por exposición a un agente esterilizante

Si se grafica el logaritmo del N^o de microorganismos sobrevivientes en función de la exposición al agente esterilizante, se va a obtener un gráfico semejante al de la Figura 2, donde el efecto del agente esterilizante es reflejado en una reacción cinética de primer orden con pendiente negativa. La pendiente de la recta está determinada por las condiciones de esterilización y por la resistencia del microorganismo. La inversa de la pendiente es el valor D , que equivale a una reducción logarítmica o la reducción de un 90% de una población microbiana.

Para los fines prácticos se define el concepto de Nivel de Seguridad de Esterilidad (SAL) para describir la población microbiana que fue destruida por un proceso de esterilización.

El SAL es la probabilidad de que una unidad de producto no sea estéril después que ha sido sometida a un proceso de esterilización.

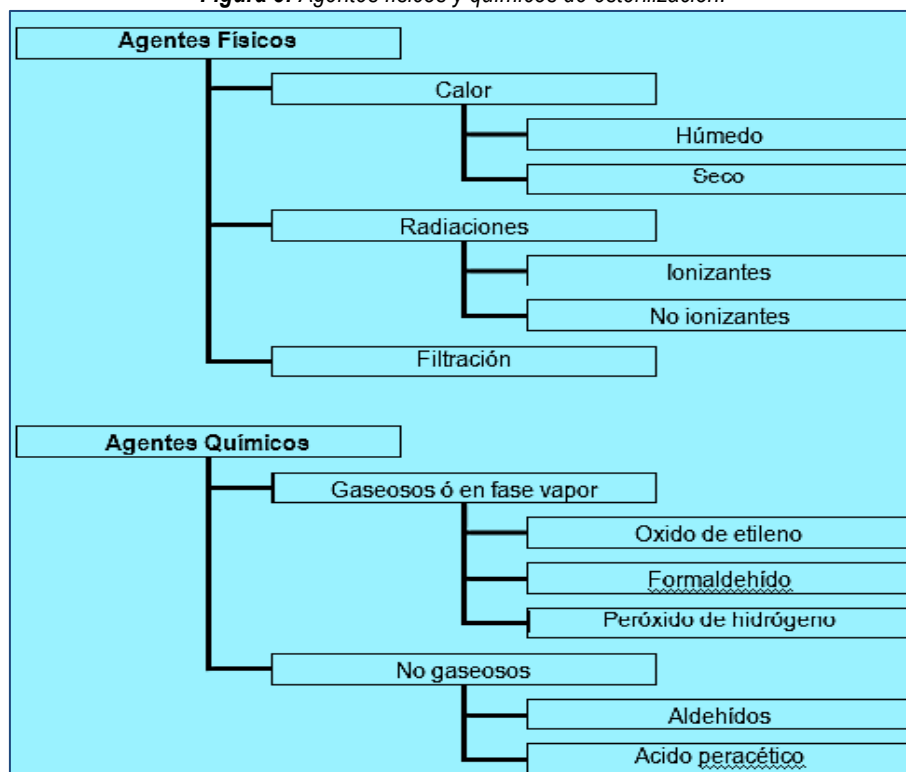
Para etiquetar un producto como "estéril", se deben cumplir requisitos específicos de validación y monitoreo de rutina del proceso de esterilización, demostrando que se alcanza un SAL de 10^{-6} , equivalente a la probabilidad de encontrar un microorganismo viable en una unidad de producto entre 1 millón de unidades de productos, después de haberlos sometido a un proceso de esterilización [3].



Métodos de esterilización

El procedimiento a utilizar en la esterilización de un dispositivo de uso médico, medicamento, materia prima o envase queda determinado en gran medida por la naturaleza del producto. Es importante recordar que una misma técnica de esterilización no puede aplicarse universalmente debido a que determinadas propiedades de algunos productos pueden modificarse o destruirse. Los métodos de esterilización se pueden clasificar según se realice con agentes físicos y químicos según la Figura 3.

Figura 3: Agentes físicos y químicos de esterilización.



1. Esterilización por agentes físicos

El calor se puede aplicar como agente esterilizante de dos formas: el calor húmedo, el cual destruye a los microorganismos por desnaturalización de las proteínas, y el calor seco que destruye a los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares.

La radiación, o emisión y propagación de la energía a través de un medio, puede ser utilizada como agente para la inactivación de microorganismos por su efecto sobre los ácidos nucleicos principalmente. Las radiaciones ionizantes (gamma, electrones acelerados o Rayos X) son altamente penetrantes, lo que permite esterilizar grandes volúmenes, mientras que las radiaciones no ionizantes sólo pueden ser utilizadas para esterilización de superficies, ya que no son penetrantes por su baja energía (ej. luz ultravioleta).

La filtración es el único método no letal que permite remover los microorganismos presentes en el producto, reteniéndolos sobre la superficie de un material filtrante.

2. Esterilización por agentes químicos

Tienen la capacidad de reaccionar con gran facilidad con diferentes grupos funcionales de ácidos nucleicos y proteínas modificando estos componentes esenciales de los microorganismos y alterando su viabilidad.

Los agentes químicos gaseosos, como el óxido de etileno y el formaldehído son alquilantes que inutilizan grupos funcionales responsables de actividades vitales de las células. El formaldehído es un gas fácilmente soluble en agua que se utiliza vaporizado en cámara cerrada en concentraciones desde un 2 a un 40 %, en la esterilización hospitalaria y en la industria farmacéutica. Se emplea asimismo como desinfectante de superficies.

Otros aldehídos y diversos agentes químicos no gaseosos se utilizan en solución principalmente para la esterilización o desinfección de materiales por inmersión.

Consideraciones generales de la validación de los procesos de esterilización

Todos los procesos de esterilización se deben validar para poder asegurar la efectividad de los mismos, y controlar, para verificar su cumplimiento en los sucesivos lotes de esterilización.

La validación de cualquier método de esterilización debe comprender como mínimo los siguientes puntos ^[3]:

1. Calificación del producto. Se debe considerar el efecto del agente esterilizante sobre los materiales del producto y sus envases.
2. Se debe establecer la intensidad mínima del tratamiento, teniendo en cuenta:
 - a. El SAL
 - b. El recuento microbiano del producto antes del tratamiento de esterilización
 - c. El valor D de la población microbiana tomada como referencia o del testigo biológico utilizado
 - d. El acondicionamiento del producto en el esterilizador, considerando la uniformidad y diseño de la carga.
3. Se deben establecer los parámetros críticos que se controlarán en cada proceso
4. Se debe establecer la frecuencia de las verificaciones del control de proceso y de la calibración del instrumental.
5. Se debe establecer la calidad, cantidad y ubicación de los monitores a colocar en cada ciclo de esterilización. Los monitores son dispositivos sensibles al agente esterilizante que permite cuantificar la intensidad de tratamiento de los productos por ciclo de esterilización.
6. Se debe establecer las condiciones de depósito del producto tratado previo a la comercialización o uso.
7. Cuando el producto no sea para usar una única vez, se debe establecer la compatibilidad de la

reesterilización con el método empleado validado.

8. Se debe definir condiciones de sobreintensidad de tratamiento respecto al deterioro del producto y sus envases.
9. Se debe demostrar que el equipo o instalación tiene la capacidad de operar dentro de los parámetros requeridos. Cuando se emplean gases, se debe validar además el proceso de aireación.
10. Se debe realizar la revalidación del proceso de esterilización con una periodicidad establecida, o cuando se hayan modificado los envases, el proceso o el equipamiento.
11. Los resultados obtenidos en la validación y revalidaciones del proceso se deben registrar y conservar por un tiempo determinado (mínimo de 2 años después de la validación)

Existen normas internacionales que sirven de guía para cumplimentar las etapas de la validación de un método de esterilización. La norma ISO 14937 [4], se puede aplicar a cualquier método esterilizante, aunque para los métodos de esterilización más utilizados, como los mencionados en la Tabla 1, existen normas específicas. La validación y control de rutina de los métodos de esterilización más utilizados serán descritos en los capítulos correspondientes.

Cuando el proceso ha sido validado para un determinado producto, los parámetros mínimos a controlar y registrar en cada ciclo de esterilización, según el método utilizado son los indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: *Parámetros mínimos a controlar y registrar.*

Parámetro o factor	Calor seco	Vapor	Gases	Radiación ionizante		
				Gamma	Haces de e	Rayos X
Tiempo	Si	Si	Si	Si (dosis)	Si (dosis)	Si (dosis)
Temperatura	Si	Si	Si	No	No	No
Presión	No	Si	Si	No	No	No
Vacío	No	Si	Si	No	No	No
Concentración o difusión	No	Si	Si	No	No	No
Humedad	No	Si	Si	No	No	No
Variación energía	No	No	No	No	Si	Si
Monitores	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Vida útil de los materiales esterilizados

Una vez que un material está esterilizado puede mantener la condición estéril si se encuentra protegido en la forma apropiada. Es decir, la duración de la esterilidad de un material no está relacionada directamente con el tiempo, sino con factores que comprometen su exposición al medio ambiente.

La vida útil de los productos médicos está determinada por 3 principios fundamentales:

- La aplicación de procesos de esterilización validados y controlados;

- La estabilidad de los materiales que componen el producto, lo que determinará el mantenimiento de las propiedades físico-químicas, la funcionalidad y biocompatibilidad;
- La estabilidad de los materiales que componen el envase (incluidos adhesivos y selladuras), lo que determinará el período de tiempo que funcione como barrera microbiana, mecánica y sin interacción con el producto médico (no tóxico)

Aplicación en productos médicos y limitaciones del método

En la Tabla 2 se muestran las limitaciones y ejemplos de aplicación de los diferentes métodos de esterilización.

Método	Limitaciones	Ejemplos de aplicación
Calor húmedo	No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos. Se debe secar el material	Medios de cultivo, diluyentes, textiles, Instrumental y material de curación hospitalarios. Conservas alimenticias
Calor seco	Son necesarias altas temperaturas, con lo cual los instrumentos a esterilizar pueden ser deteriorados por el excesivo calor.	Polvos inertes, sustancias oleosas, material metálico y algunos materiales de vidrio
Radiación	Se requiere instalaciones especiales; No se recomienda la esterilización de soluciones.	Productos médicos, envases de productos farmacéuticos Insumos hospitalarios y de laboratorio, Productos alimenticios Materias primas farmacéuticas y cosméticas, productos cosméticos y medicamentos
Óxido de etileno	Requiere instalaciones especiales; es necesario ventilación forzada de los productos previo a su uso	Productos médicos Especias alimenticias Insumos hospitalarios Principios activos sólidos deteriorables por radiación, equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias
Filtración	Solo soluciones o gases filtrables; no retienen virus ni micoplasmas	Gases medicinales o ambientales Soluciones oleosas o soluciones termolábiles

Tabla 2: Métodos de esterilización, sus limitaciones y aplicación.

Bibliografía

1. Block, S.S: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 5th edition, Part IV. Lippincott, Williams and Wilkins, 2000
2. Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 3rd edition; Part III. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1999
3. Ministerio de Salud y Acción Social N° 255/94.
4. UNE-EN ISO 14937. *Esterilización de productos sanitarios. Requisitos generales para la caracterización de un agente esterilizante y para el desarrollo, la validación y el control de rutina de un proceso de esterilización para productos sanitarios*. Mayo 2010.

Esterilización por Calor Húmedo

Federico Kurt Lungwitz y Nora Carbone

- *Fundamentos y características del método*
- *Principios físico-químicos en la esterilización por Calor húmedo – Variables termodinámicas*
- *Esterilizadores*
- *Proceso: sistemas y ciclos aplicables a diferentes productos; empaques y envases; validación*
- *Monitoreo periódico y control de ciclos de rutina*
- *Liberación de la carga*
- *Aplicación hospitalaria e industrial*
- *Incompatibilidades y limitaciones*
- *Bibliografía*

Fundamentos y características del método

El vapor de agua saturado bajo presión a temperaturas $\geq 121^{\circ}\text{C}$ constituye el agente esterilizante de elección por sobre cualquier otro método alternativo, destruyendo las formas esporuladas de las bacterias en un corto tiempo de exposición. ^{(1), (2)}

El calor asociado a humedad produce la destrucción microbiana por medio de la desnaturalización irreversible de enzimas y proteínas estructurales. ^{(1), (3)}

El vapor de agua en su punto de saturación, a la temperatura de condensación, es un medio mucho más eficiente para la destrucción de microorganismos que el calor seco o que el agua a la misma temperatura. Por ejemplo, a una temperatura de 100°C , la cantidad de calorías cedidas por el vapor saturado es siete veces superior que el disponible de la misma masa en gramos de agua en ebullición. ⁽³⁾

Las formas vegetativas de las bacterias no sobreviven a la exposición al calor húmedo por más de 10 minutos a 80°C ó 15 minutos a 73°C , mientras que las formas esporuladas requieren exposición a temperaturas mucho más elevadas. ⁽³⁾

Esta resistencia elevada al calor se explica por la composición química de la pared celular. En las formas esporuladas tanto aerobias como anaerobias de diferentes bacterias Gram positivas, de un 5 a un 15 % de su peso en seco consiste en ácido dipicolínico, sustancia que bajo la forma de sal cálcica es la principal responsable de la elevada resistencia al calor. ⁽¹⁾

Los tiempos de muerte térmica de hongos y protozoos expuestos al calor húmedo son similares a los hallados para bacterias no formadoras de esporas. ⁽³⁾ La mayoría de los virus se inactivan por calor húmedo a 60°C dentro de los 20 minutos, con excepción del virus de la Polio y el de la Hepatitis B, que requieren para su inactivación tiempos de exposición más elevados y temperaturas más altas. ⁽³⁾

El tiempo y temperatura estándar mínimos recomendados para la esterilización por vapor de agua saturado, es la equivalente a la exposición efectiva del producto a 15 minutos a 121°C ^{(2), (3)}

Como excepción, el agente causal del síndrome de Creutzfeldt-Jakob es el de más alta resistencia al calor

húmedo, requiriéndose para su inactivación un ciclo de exposición al vapor de agua de 18 minutos a 134 °C, siendo este tratamiento el opcional para su inactivación tras la incineración. ⁽³⁾

Principios físico-químicos en la esterilización por Calor húmedo: Variables termodinámicas

La razón de la extraordinaria eficacia de la esterilización por vapor de agua, radica en la gran cantidad de energía almacenada en el vapor de agua saturado bajo la forma de calor latente.

El calor latente de vaporización se define como la cantidad de calorías por unidad de masa que es necesario entregar a una sustancia al estado líquido a su temperatura de ebullición, para lograr su transformación en vapor saturado. En el caso del agua este valor es de 540 cal / g a 100 °C

Para describir cómo se produce el proceso de transferencia de calor del vapor de agua hacia los productos a esterilizar, tomemos como ejemplo la esterilización de una carga sólida porosa: eliminado previamente un elevado porcentaje del aire de la cámara y del producto a esterilizar, el vapor de agua interactúa con los materiales realizando una transferencia de calor, principalmente por el mecanismo de convección. El vapor entra en contacto, cediendo su calor latente de vaporización y calentando el material; el material se humecta, así como los gérmenes contenidos en él, mientras que este vapor se condensa, manteniéndose el condensado a la misma temperatura que la del vapor saturado con el que se encuentra en equilibrio.

En esas condiciones se produce contracción de volumen, lo que produce vacío local que permite el pasaje de nuevas fracciones de vapor a través del material. El proceso se produce infinitas veces a medida que el vapor penetra en el material a esterilizar, hasta lograr el equilibrio de temperaturas. ⁽²⁾

Dos de los factores críticos a tener en cuenta en el desarrollo del proceso son: la remoción del aire de la cámara y de la carga y la calidad del vapor de agua. ^{(1), (3)}

Remoción de aire:

La presencia de aire en la cámara del autoclave es el principal factor que actúa en detrimento de la eficiencia de la esterilización por vapor, ya que altera la relación presión – temperatura de la curva de equilibrio líquido – vapor^{(1),(3)}

Por ejemplo, a una presión de 2 Bar absolutos, el vapor saturado tiene una temperatura de 121 °C si ha sido removida previamente la totalidad del aire; si sólo se remueve un 50% del aire y otros gases no condensables, la temperatura resultante de la mezcla aire – vapor a la misma presión es de sólo 112 °C.

La presencia de aire en el interior del material a esterilizar, por la creación de zonas frías ó “cold spots”, puede llegar a impedir la esterilización de la carga completa, resultando insuficiente el tiempo de contacto con el vapor a la temperatura especificada ⁽³⁾

Las técnicas utilizadas históricamente para remover el aire de la cámara son: ⁽¹⁾

➤ *Desplazamiento del aire por “flujo de masa del vapor”:*

Se realiza el desplazamiento del aire por arrastre con el vapor, obligando a la mezcla de gases a eliminarse por válvulas de escape ubicadas en la parte superior de la cámara. Éste es el mecanismo utilizado en los tradicionales autoclaves “Chamberland” de uso en microbiología.

➤ *Desplazamiento por gravedad:*

Basado en el principio de aprovechamiento de la densidad relativa del aire superior a la del vapor de agua (relación 3:1), con el efecto adicional del desplazamiento de masa por el flujo del vapor, que obliga al aire a eliminarse por válvulas de escape ubicadas en la parte inferior de la cámara.

➤ *Utilización de alto vacío:*

Consiste en efectuar una única etapa de vacío profundo; se recomienda llegar hasta 20 mmHg antes de la admisión del vapor saturado. La utilización de esta metodología ha demostrado que causa deshidratación en paquetes textiles y generación de sobrecalentamiento del vapor. Se produce importante gasto de energía y desgaste de componentes al efectuar vacío profundo durante un tiempo prolongado.

➤ *Vacío fraccionado, ó sistema “pulsing”:*

Consiste en una secuencia de etapas de remoción de aire por sistema de vacío del autoclave hasta un valor de vacío predeterminado, alternadas con etapas de inyección de vapor saturado hasta una presión positiva preestablecida. Tras un primer vacío, la inyección de vapor a velocidad controlada actúa como diluyente del aire, evacuándose la mezcla resultante de aire y vapor por el sistema de vacío. Cuanto más profundo es el vacío durante la evacuación y más alta la presión del vapor en la inyección de vapor subsiguiente, mayor es la tasa de remoción de aire en cada pulso.

Durante la etapa de sobrepresión, el flujo de vapor facilita la compresión del aire dentro del paquete de material y el avance del vapor a través del mismo. En la etapa siguiente de evacuación a presión subatmosférica, el aire atrapado en la carga se expande, mientras que el vapor condensado dentro del paquete se reevapora, empujando al aire fuera del paquete. Para la esterilización de cargas densas y porosas, puede requerirse la repetición de hasta 3 secuencias sucesivas de vacío e inyección de vapor a sobrepresión para lograr una presión parcial del aire inferior a 5 mmHg.

➤ *Sistema “pulsing” con desplazamiento por gravedad.*

Una modificación del sistema “pulsing” consiste en adicionar el efecto de desplazamiento por gravedad en la etapa de remoción de la mezcla aire-vapor por el sistema de evacuación del esterilizador. Para ello, a diferencia del sistema “pulsing” convencional, el nivel de vacío en cada pulso se mantiene unos instantes permitiendo que el vapor desplace por gravedad al aire, de mayor densidad. Este sistema demuestra ser la forma más efectiva para la remoción del aire, ya que introduce una mejora en el sistema “pulsing” tradicional al minimizar la reentrada de aire durante las etapas de presurización con vapor.

Calidad del vapor: título y grado de sobre-calentamiento:

Se define como título de vapor a la masa porcentual de vapor saturado seco presente en una mezcla de vapor saturado seco, agua y gases no condensables⁽¹⁾. Por ejemplo, si el título de vapor es de 97%, esto significa que contiene 3 partes en peso de agua bajo el estado líquido y gases no condensables, y 97 partes en peso de vapor saturado bajo el estado físico de vapor.

El límite aceptable es un título $\geq$ a 95%, siendo lo ideal llegar a un 100% de vapor bajo la forma de vapor saturado⁽⁴⁾. El vapor húmedo (título inferior a 95 %) ó sobresaturado es causal de humedad excesiva en los productos y/o en sus empaques, e interfiere con la penetración del vapor y la completa remoción del aire en el interior del paquete. ⁽¹⁾

Los principales responsables de este fenómeno son el flujo de ingreso del vapor a cámara a gran velocidad, produciendo condensación en la pared de tuberías; y un sistema deficiente de trampas de condensado en la línea de vapor desde su generación al punto de uso.

El grado de sobrecalentamiento del vapor de agua es el número de grados centígrados en exceso respecto de la temperatura del vapor saturado seco a la misma presión ⁽¹⁾. El vapor de agua sobrecalentado se comporta como cualquier mezcla de gases. En contacto con una superficie mas fría que la temperatura de equilibrio líquido – vapor correspondiente a la presión de trabajo, el vapor sobrecalentado pierde su adicional energía calórica, disminuyendo su temperatura, a diferencia del vapor saturado, que cede su calor a temperatura constante. ⁽³⁾

Si bien un sobrecalentamiento de hasta 5°C de exceso puede tolerarse sin inconvenientes, está comprobado que niveles superiores a ese límite producen una importante disminución en la velocidad de destrucción de esporulados (Walter, 1948; Savage, 1937)

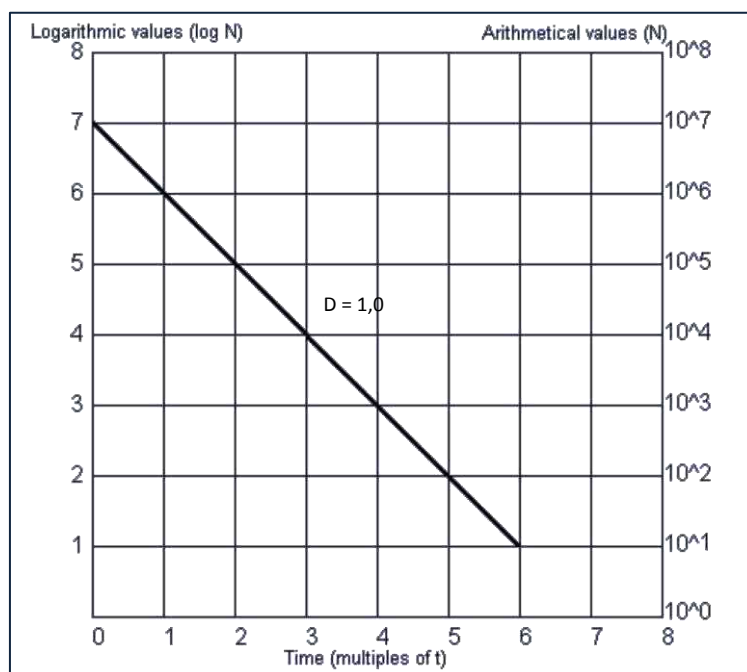
La principal causa del sobrecalentamiento es la reducción brusca de la presión cuando el vapor es conducido en la línea de vapor hasta el punto de uso por medio de válvulas reductoras, a temperatura constante, por lo que se altera la relación de equilibrio presión – temperatura.

Variables termodinámicas de la esterilización por calor húmedo:

La degradación de los microorganismos por acción de la temperatura responde a una cinética de reacción de primer orden ^{(1), (2), (3)}, tal como se explicó en el Capítulo II.2 – Esterilización: Generalidades. De acuerdo a esta cinética, los microorganismos mueren en progresión geométrica, es decir, en intervalos iguales y sucesivos de tiempo de exposición a temperatura constante, se destruye un mismo porcentaje de los microorganismos que resta degradar.

El Gráfico 1 muestra cómo la concentración de microorganismos viables N existentes al comienzo del proceso desciende exponencialmente con el tiempo de exposición al calor.

Gráfico 1: Cinética de muerte microbiana por acción del calor a una determinada temperatura (escala semilogarítmica)



Para que sea posible evaluar la capacidad de destrucción térmica de un proceso de esterilización, se utilizan las siguientes variables:

Valor D: tiempo de exposición a temperatura constante necesario para inactivar el 90% de una población microbiana

Valor z: diferencia de temperatura necesaria para modificar el valor D en un factor de 10

Valor F: medida de letalidad ó efecto esterilizante de un proceso específico

El uso de los valores D, Z y F permite comparar la efectividad de diferentes procesos de esterilización utilizando un modelo matemático.

Valor D – Tiempo de Reducción Decimal

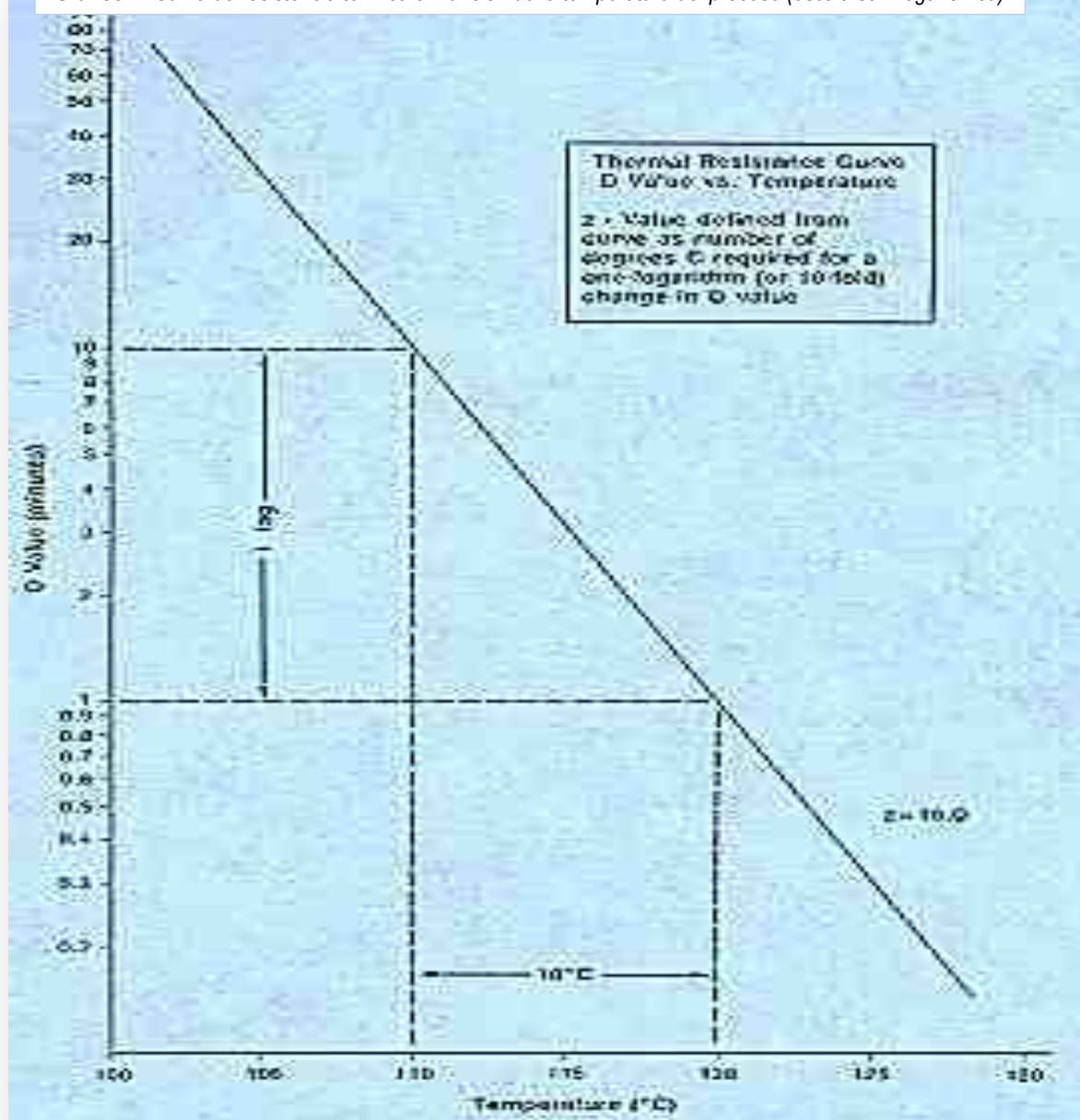
D es el tiempo necesario para reducir en 1 logaritmo una población microbiana específica, considerando que el proceso se desarrolla a una temperatura específica constante T

El valor D en la esterilización por calor depende de cada especie de microorganismo y de su resistencia a la temperatura T. El valor D se expresa en minutos.

Valor z – Coeficiente de Temperatura de Destrucción

El valor z es la diferencia de temperatura necesaria para causar una variación de 1 logaritmo en el valor D. El valor z se expresa en °C.

Gráfico 2: Curva de resistencia térmica en función de la temperatura del proceso (escala semilogarítmica)



Valores D y z habitualmente utilizados

En la esterilización por vapor a 121 °C, el valor D para diferentes microorganismos oscila entre 0,2 y 2 minutos. Habitualmente se asume $D_{121} = 1$ min para los microorganismos vegetativos. Para el microorganismo esporulado de referencia del método, *Geobacillus stearothermophilus*, el valor de D a 121 °C se aproxima a 2 minutos.

El valor z oscila entre 6 y 13 °C para microorganismos de referencia en la esterilización por vapor.

Habitualmente se asume $Z = 10^{\circ}\text{C}$ a falta de datos más precisos.

Valor F: Letalidad ó Punto de muerte térmica

En los procesos de esterilización por calor nos interesa integrar el efecto letal dentro del rango de temperaturas y tiempo en que se desarrolla el proceso; así como determinar letalidades equivalentes a distintas temperaturas de

proceso. Para resolver este tipo de problemas se utiliza la variable matemática F_0 , ó Punto de muerte térmica.

Si relacionamos para un microorganismo hipotético los tiempos de muerte térmica para cada temperatura de exposición al calor, obtendremos una recta de pendiente negativa, definida por la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Log } F_{Tx} = 1/Z (T_r - T_x) + \text{Log } F_{Tr}$$

donde: F_{Tx} = Tiempo de muerte térmica a la temperatura X (proceso real)

F_{Tr} = Tiempo de muerte térmica a la temperatura de referencia

T_x = Temperatura correspondiente a F_{Tx} (proceso real)

T_r = Temperatura de referencia

Si relacionamos el tiempo de muerte térmica a la temperatura de referencia (121 °C) con el correspondiente a otra temperatura X, tendremos:

$$F_{Tr} / F_{Tx} = 10^{T_x - 121} = L : \text{Letalidad},$$

(donde z = se toma por convención como 10 °C)

L : Letalidad, (donde z = se toma por convención como 10 °C)

La Letalidad representa entonces el tiempo equivalente a 121 °C (T_r), que produce el mismo efecto letal que la exposición durante 1 minuto a la temperatura real del proceso (T_x).

El tiempo equivalente de exposición a 121 °C para todo el proceso, que atravesará distintas temperaturas en cada intervalo de tiempo, se define como F_0 , ó Letalidad acumulada por la carga en el tiempo. El valor F_0 es entonces el tiempo de exposición equivalente, expresado en minutos a 121°C, (proceso ideal) que corresponde a la exposición a temperatura variable (proceso real), calculado para un microorganismo específico con un coeficiente de temperatura $z = 10^\circ\text{C}$

$$F_0: \int L. dt$$

Tomando intervalos finitos de tiempo, esta integral se puede representar también por la ecuación:

$$F_0: \sum L. \Delta t$$

Esta fórmula es la que utilizan los esterilizadores por vapor y los validadores externos al autoclave para realizar el cálculo de esta variable de ingeniería, F_0 , durante la ejecución de los ciclos de esterilización.

La Tabla 1 muestra valores típicos de F_0 a distintas temperaturas.

El cálculo de la letalidad o tiempo equivalente a una exposición a 121 °C, es especialmente útil en la validación y control de ciclos de esterilización a temperaturas de 121 °C ó inferiores, ya que permite con certeza conocer cuál fue la letalidad acumulada por la carga.

Por el contrario, su relevancia es mínima en ciclos a 132-134 °C, donde su valor, aún para ciclos cortos de 3 minutos de exposición, siempre supera el criterio de aceptación habitual de F_0 en el punto más frío (F_0 mínimo) de 12 minutos. Como se puede observar en la Tabla 1, sólo 1 minuto de exposición a 134 °C tiene una letalidad equivalente a casi 20 minutos a 121 °C.

Tabla 1: Letalidades equivalentes a diferentes temperaturas de esterilizado

Temperatura referencia Tr	121	°C			
valor Z	10	°C			
Temperatura de Proceso (°C)	Letalidad F0 (minutos)				
	+ 0,0	+ 0,2	+ 0,4	+ 0,6	+ 0,8
100	0,008	0,008	0,009	0,009	0,010
101	0,010	0,010	0,011	0,011	0,012
102	0,013	0,013	0,014	0,014	0,015
103	0,016	0,017	0,017	0,018	0,019
104	0,020	0,021	0,022	0,023	0,024
105	0,025	0,026	0,028	0,029	0,030
106	0,032	0,033	0,035	0,036	0,038
107	0,040	0,042	0,044	0,046	0,048
108	0,050	0,052	0,055	0,058	0,060
109	0,063	0,066	0,069	0,072	0,076
110	0,079	0,083	0,087	0,091	0,095
111	0,100	0,105	0,110	0,115	0,120
112	0,126	0,132	0,138	0,145	0,151
113	0,158	0,166	0,174	0,182	0,191
114	0,200	0,209	0,219	0,229	0,240
115	0,251	0,263	0,275	0,288	0,302
116	0,316	0,331	0,347	0,363	0,380
117	0,398	0,417	0,437	0,457	0,479
118	0,501	0,525	0,550	0,575	0,603
119	0,631	0,661	0,692	0,724	0,759
120	0,794	0,832	0,871	0,912	0,955
121	1,00	1,05	1,10	1,15	1,20
122	1,26	1,32	1,38	1,45	1,51
123	1,58	1,66	1,74	1,82	1,91
124	2,00	2,09	2,19	2,29	2,40
125	2,51	2,63	2,75	2,88	3,02
126	3,16	3,31	3,47	3,63	3,80
127	3,98	4,17	4,37	4,57	4,79
128	5,01	5,25	5,50	5,75	6,03
129	6,31	6,61	6,92	7,24	7,59
130	7,94	8,32	8,71	9,12	9,55
131	10,00	10,47	10,96	11,48	12,02
132	12,59	13,18	13,80	14,45	15,14
133	15,85	16,60	17,38	18,20	19,05
134	19,95	20,89	21,88	22,91	23,99
135	25,12	26,30	27,54	28,84	30,20

Esterilizadores

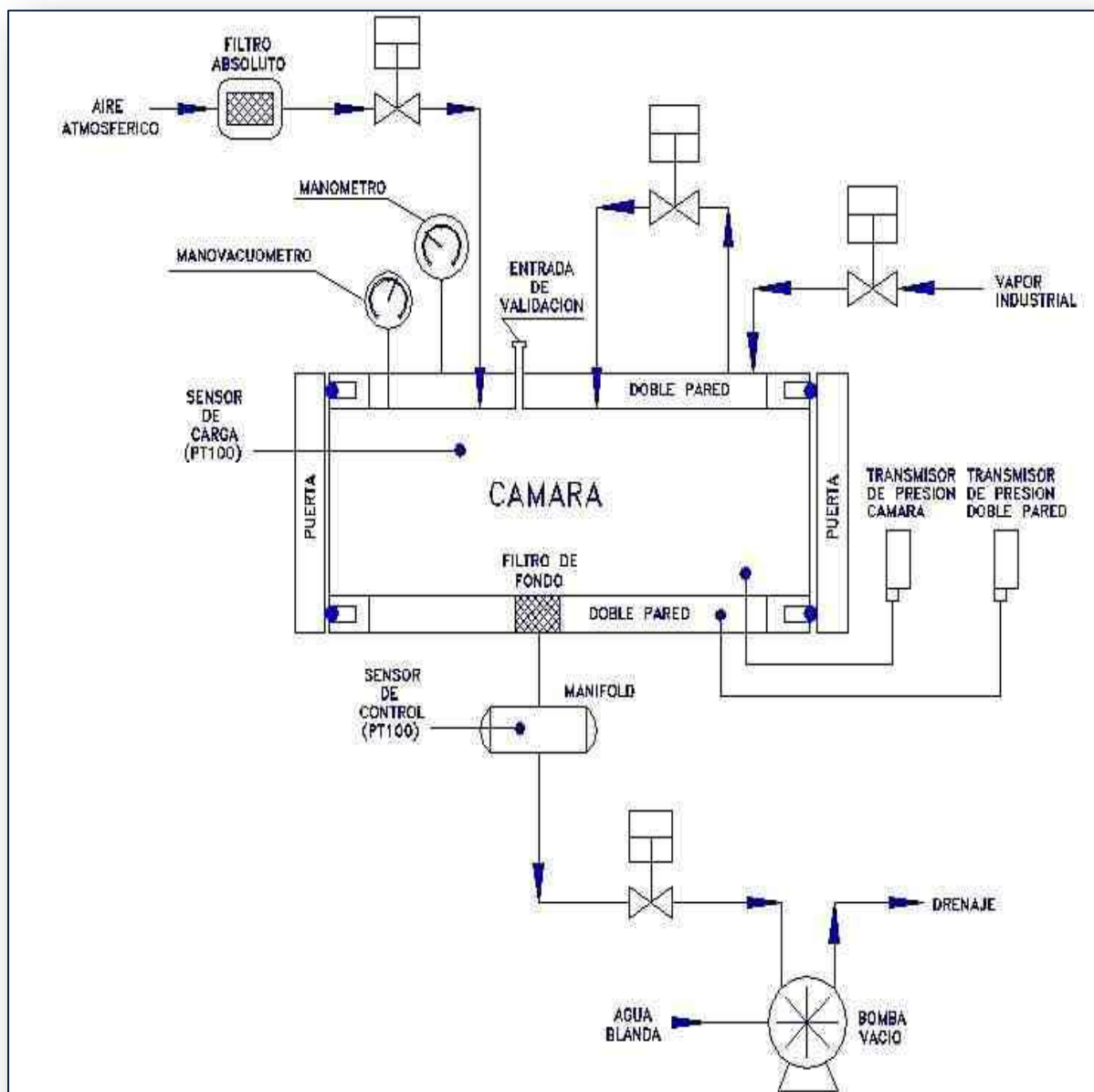
El equipamiento para este método se presenta en una variedad importante de tamaños, diseño y variantes de tecnología, dependiendo del uso al que está destinado (esterilización de soluciones parenterales, insumos hospitalarios, materiales y medios de cultivo para laboratorio de microbiología, etc)⁽¹⁾.

Podemos clasificar los esterilizadores disponibles en los siguientes tipos:

- Autoclaves por Vapor de Agua saturado seco, para todo tipo de materiales
- Autoclaves de mesada, para instrumental de pequeñas dimensiones
- Autoclaves por Lluvia de Agua Sobrecalentada con Presión Compensada, para soluciones parenterales en envases flexibles

Describiremos los lineamientos generales constructivos de un autoclave del tipo “multipropósito”, cuyo esquema se resume en la Figura 1, diseñado para esterilizar con diferentes programas cargas sólidas porosas y/o no porosas; así como cargas líquidas en envases herméticos.

Figura 1: Diagrama de Autoclave multipropósito con conexiones a instrumentos y tuberías



Estructura: básicamente un autoclave consiste en una cámara hermética construida en acero, de forma cuadrangular o cilíndrica, dispuesta horizontal o verticalmente.

La cámara puede estar equipada con sólo una puerta para carga y descarga de materiales o bien con dos puertas ubicadas en las áreas anterior o de carga y posterior o de descarga de materiales. La cantidad de puertas dependerá de si el esterilizador comunica dos áreas contiguas a modo de esclusa o no.

Cada puerta posee un mecanismo que permite su sellado hermético a la cámara e impedir su apertura durante el

proceso. En los equipos de dos puertas este mecanismo también impide la apertura simultánea de las mismas en todo momento, para evitar la comunicación de dos áreas diferentes.

Una chaqueta o camisa construida en acero cubre externamente toda o parte de la superficie de la cámara interna, con excepción de las puertas y la parte posterior del equipo en caso de equipos de una puerta. ⁽¹⁾

Otro elemento adicional es el separador ó bafle deflector del vapor ingresante. ⁽¹⁾

Calefacción: tanto la cámara interna como la chaqueta son calefaccionadas con vapor de agua, que puede ser suministrado por un generador / caldera incorporado al esterilizador o externo, alimentado por gas o electricidad.

Automatismo: Tanto el ingreso de vapor y la eliminación de aire y condensado como el mantenimiento de las diferentes presiones y temperaturas de trabajo son controladas por medio de un automatismo. El automatismo incluye entre otras cosas un controlador microprocesado que recibe información del estado del proceso desde los diferentes instrumentos de medición (transmisores de presión, sensores de temperatura, presostatos, termostatos, sensores de posición y temporizadores).

Con esta información y un software específico, el controlador comanda las diferentes válvulas y bombas actuadas de acuerdo a cada etapa que compone el proceso.

Normalmente los esterilizadores poseen dos sensores de temperatura; uno localizado fijo en la línea de drenaje de condensado de cámara (representativo del punto más frío de la cámara) y otro libre en el interior de la cámara (para insertar en un punto representativo de la carga). Los ciclos de esterilización de materiales sólidos porosos y no porosos deben ser comandados por el sensor de cámara; mientras que los ciclos de líquidos – principalmente volúmenes medianos y grandes, superiores a 50 o 100 ml. – deben ser comandados por el sensor de carga. El mismo debe ser colocado manualmente (sumergido en el líquido) dentro de la carga.

En esterilizadores que permiten realizar secado final de la carga por vacío, la restitución de la presión atmosférica de la cámara se efectúa mediante ingreso de aire atmosférico a través de la válvula de aireación y un filtro HEPA, que impide la recontaminación del material esterilizado. ^{(3), (4)}

Seguridad: la cámara interna y la chaqueta están equipadas con válvulas de seguridad y alivio que actúan en caso de sobrepasarse la presión máxima permitida.

Los servicios o suministros conexcionados al esterilizador comprenden:

- Electricidad – Fuerza motriz, en formato 3 x 220 / 380 VCA x 50 / 60 Hz con Neutro y Tierra
- Vapor de Agua, libre de condensado y partículas, en caso que el esterilizador no posea su propio generador de vapor. Es recomendable instalar purgadores y/o separadores de gota y filtros al ingreso del vapor a cámara ⁽¹⁾
- Agua Purificada, para alimentar el generador de vapor.
- Agua Potable Blanda, a temperatura ambiente, para alimentar la bomba de vacío
- Aire Comprimido, libre de agua, aceite y partículas, en caso que el esterilizador incluya válvulas actuadas neumáticamente y no posea su propio compresor de aire
- Conexión a nivel de la base del esterilizador, para drenaje / desagüe de condensados. La tubería debe ser abierta, no ofrecer contrapresión, y resistente a 99°C
- Conexión a nivel del techo del esterilizador, para venteo de gases no condensables. La tubería debe ser abierta.

Los esterilizadores deben contar con un registrador alfanumérico o gráfico de los parámetros del proceso. ^{(4), (5)}

Proceso

Para describir las etapas de ciclos estándar utilizados en la esterilización por calor húmedo, debemos distinguir dos principios de funcionamiento y desarrollo del proceso de esterilización por vapor, totalmente diferentes:

- A) *Esterilización por Vapor de Agua saturado seco.*
- B) *Esterilización por sistema de Presión Compensada – Lluvia de Agua o Mezcla de Aire y Vapor.*

A) Esterilización por vapor saturado seco:

En este caso el agente esterilizante, el vapor saturado seco, toma contacto íntimo con los productos a esterilizar

De acuerdo al sistema utilizado para lograr la remoción de aire de la cámara y de la carga, por remoción forzada de aire o por desplazamiento por gravedad, varía la tecnología empleada y la secuencia de los ciclos ⁽⁶⁾

A.1) CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR VAPOR DE AGUA CON REMOCIÓN FORZADA DEL AIRE:

Ver en la Tabla 2 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 3 el diagrama del ciclo:

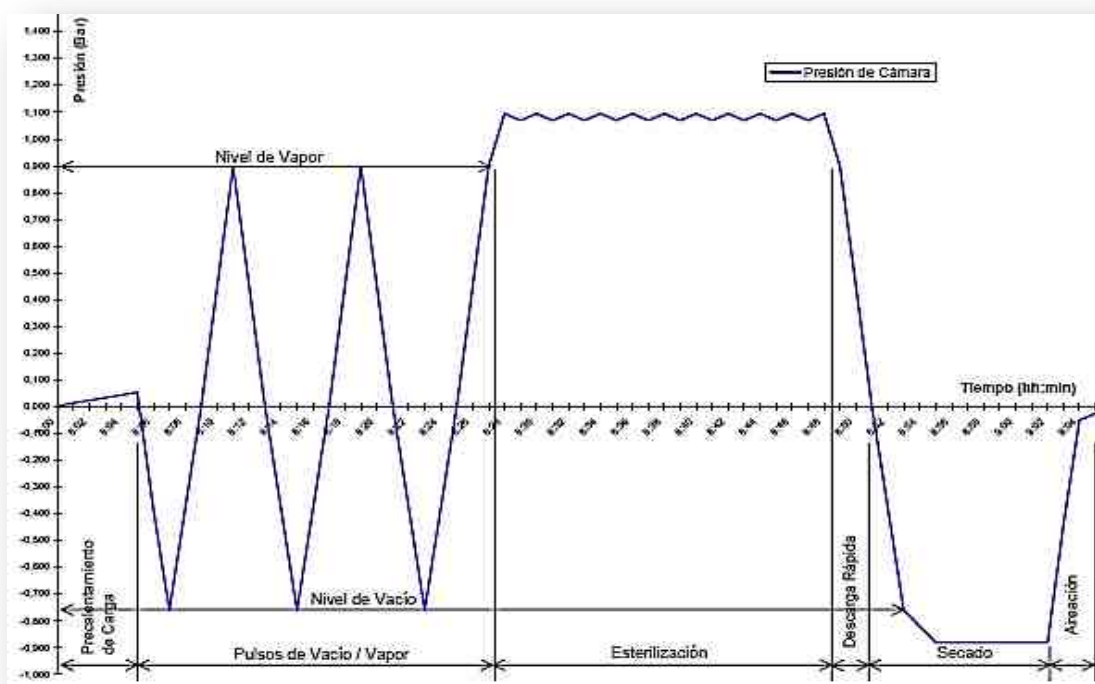
Aplicación:

En la esterilización de cargas sólidas porosas y no porosas; dispositivos con lúmenes y cavidades internas. Los parámetros recomendados para las variables del proceso utilizando esta tecnología son de 3 a 4 minutos de esterilizado a 132-134 °C, y 15 a 20 minutos de esterilizado a 121 °C. ^{(1), (2), (5), (6)}

Tabla 2. Descripción del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción forzada del aire

Etapa	Objetivo y descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Precalentar la cámara del esterilizador hasta alcanzar la temperatura de trabajo. Cargar el material a esterilizar, cerrar y bloquear la puerta. Seleccionar e iniciar el programa de esterilización adecuado.	Presión / temperatura de camisa de calefacción.
		Posibilidad de abrir la puerta de carga.
Pulso de vacío	Extraer el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Se accionan la bomba y la válvula de vacío de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar el nivel de vacío predefinido.	Nivel de vacío
		Cantidad de pulsos
Pulso de vapor	Arrastrar el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Precalentar el material a esterilizar. Se acciona la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Presión de vapor
		Cantidad de pulsos
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se acciona en forma intermitente la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Sensor en cámara o carga
		Control por tiempo o Fo
		Temperatura de esterilizado
		Tiempo de esterilizado
Descarga rápida	Desalojar el vapor y el condensado existentes en la cámara. Se acciona la válvula de descarga de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Descarga rápida
		Presión de cámara = atmosférica
Secado	Extraer el condensado y la humedad existentes en la cámara, la presión de cámara desciende por debajo de la atmosférica hasta un valor preestablecido.	Nivel de vacío
		Tiempo de secado
Aireación	Romper el vacío de cámara. Se acciona la válvula de aireación de cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Descargar el material esterilizado.	

Gráfico 3: Diagrama del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción forzada del aire



A.2) CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR VAPOR DE AGUA CON REMOCIÓN GRAVITACIONAL DEL AIRE:

Ver en la Tabla 3 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 4 el diagrama del ciclo:

Tabla 3. Descripción del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción gravitacional del aire

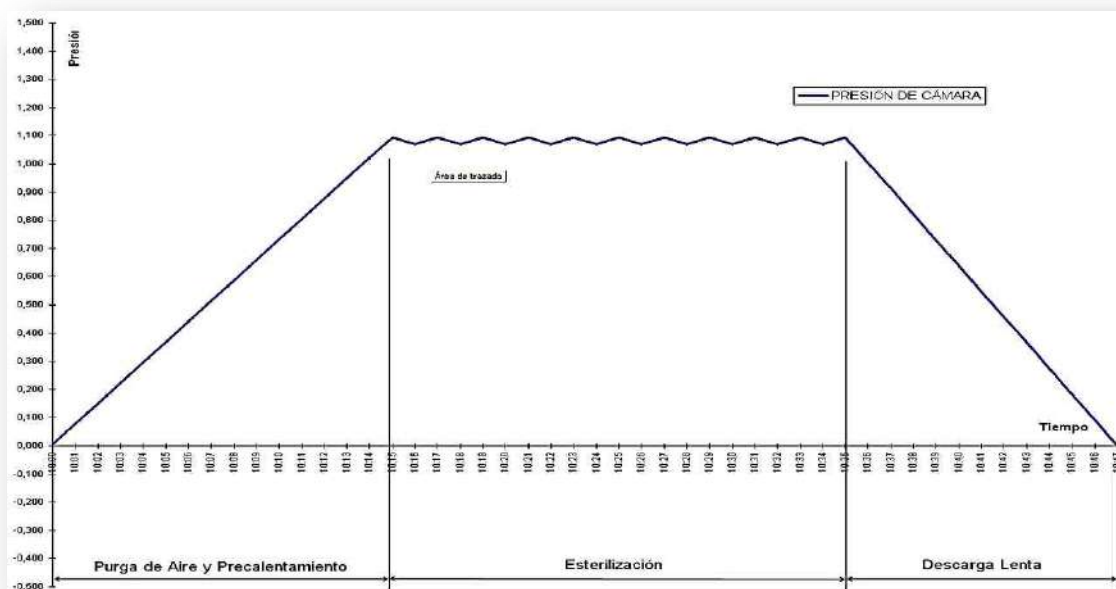
Etapa	Descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Idem ciclo con remoción forzada de aire	
Purga de aire y precalentamiento	Arrastrar el aire y el condensado existentes en la cámara y carga. Precalentar el material a esterilizar. Se acciona la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Presión de vapor
		Temperatura de precalentamiento
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se acciona en forma intermitente la válvula de vapor a cámara, la presión de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Sensor de cámara o carga
		Control por tiempo o Fo
		Temperatura de esterilizado
		Tiempo de esterilizado
Descarga lenta	Desalojar el vapor y el condensado existentes en la cámara. El vapor y el condensado escapan por la purga, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Descarga lenta
		Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Idem ciclo con remoción forzada de aire	

Aplicación

En la esterilización de soluciones parenterales en contenedores rígidos, tales como viales de vidrio borosilicato con sello precintado de goma. Los parámetros recomendados son temperatura de 121 °C durante un tiempo de exposición efectivo mínimo de 15 minutos. ⁽³⁾

Los parámetros recomendados para cargas sólidas envueltas son 15 minutos de esterilizado a 132-134 °C, y 30 minutos de esterilizado a 121 °C. ^{(1), (2), (6)}

Gráfico 4: Diagrama del ciclo de esterilización por vapor de agua con remoción gravitacional del aire



B) Esterilización por sistema de presión compensada:

Este sistema es empleado para esterilizar productos líquidos en contenedores flexibles, principalmente sueros, utilizando una sobrepresión en cámara respecto del interior del envase; esto se logra por ejemplo con una mezcla de aire y vapor de agua, o por lluvia de agua.

El motivo principal de sobrepresurizar la cámara es la de contener los envases flexibles, evitando la deformación o rotura de los mismos, ya que en ciertas etapas del ciclo la presión en el interior del envase supera la presión de cámara.

En estos procesos, ni el agua, ni el vapor de agua, ni el aire, toman contacto directo con el producto, sino que sólo actúan como medio calefactor, produciéndose la esterilización del producto "in situ", en el seno del líquido. ⁽⁷⁾

CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR LLUVIA DE AGUA SOBRE-CALENTADA, CON PRESIÓN COMPENSADA:

El proceso consiste básicamente en recircular en forma continua, una cantidad de agua grado farmacéutico suficiente para bañar toda la carga. Esta masa de agua es impulsada por una bomba centrífuga, a través de la cámara del esterilizador y de un intercambiador de calor con capacidad para calentar y enfriar. En etapas en las que es necesario aumentar la temperatura, se calienta el agua por medio de vapor industrial y en aquellas etapas en las que es necesario disminuir la temperatura, se enfria el agua por medio de agua fría.

El agua ingresa por el techo de la cámara en forma de lluvia a presión, bañando la carga a esterilizar y aportando o absorbiendo la energía térmica necesaria; luego el agua egresa por la base de la cámara. Durante todo el proceso se presuriza la cámara del esterilizador a presiones levemente superiores a las que

corresponden al equilibrio temperatura / presión del vapor saturado, acompañando los ascensos y descensos de temperatura del proceso, logrando de esta manera mantener la integridad de los productos envasados.

Cuando es necesario aumentar la presión de cámara, se inyecta aire comprimido grado farmacéutico y cuando es necesario disminuir la presión de cámara, se ventea el excedente.

Ver en la Tabla 4 la descripción del ciclo. Ver en el Gráfico 5 el diagrama del ciclo.

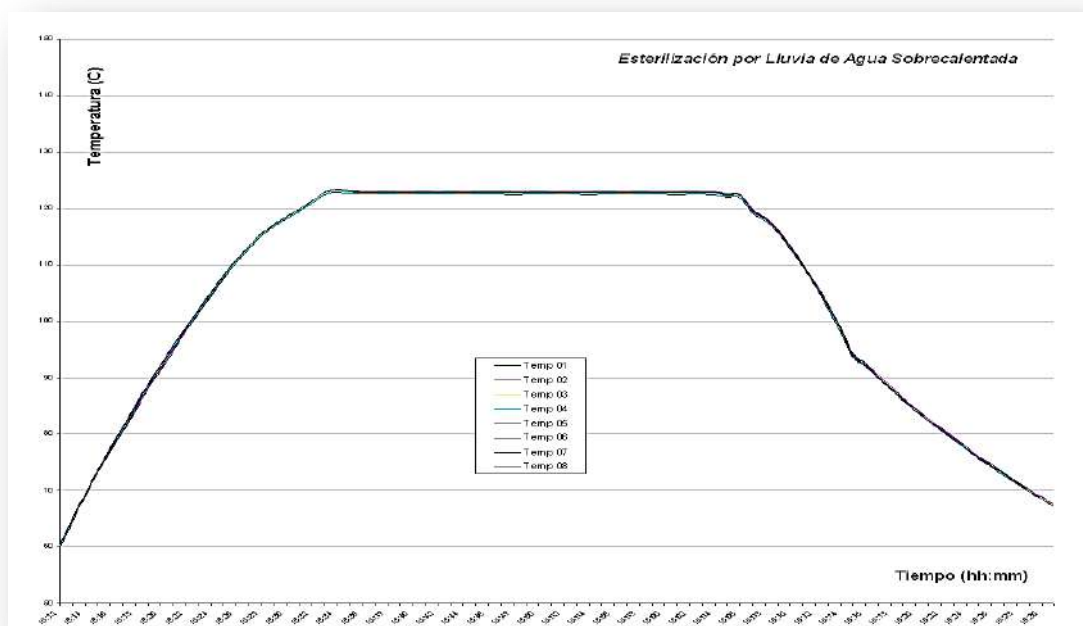
Aplicación

En la esterilización de soluciones parenterales de gran volumen. Con el empleo de contenedores de polipropileno, la temperatura del proceso puede aproximarse a la de referencia (121 °C), utilizando envases de PVC habitualmente se aplican temperaturas entre 115-117°C; mientras que la utilización de envases de polietileno flexible sólo permite tolerar temperaturas de 112-114 °C ⁽³⁾

Tabla 4. Descripción del ciclo de esterilización por lluvia de agua sobrecalentada con presión compensada

Etapas	Objetivo y descripción de etapa	Variables de etapa
Stand-by	Cargar el material a esterilizar, cerrar y bloquear la puerta. Seleccionar e iniciar el programa de esterilización adecuado.	Posibilidad de abrir la puerta de carga.
Carga de agua	Cargar en la cámara la cantidad de agua necesaria para el desarrollo del ciclo. Se acciona la válvula de carga de agua a la cámara, el nivel de agua en la cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Nivel de agua en cámara
Precalentamiento	Precalentar el material a esterilizar. Se accionan la bomba de recirculación y la válvula de calefacción de agua en cámara (vapor a intercambiador de calor), la temperatura de cámara asciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Temperatura de precalentamiento
		Presión compensada
Esterilizado	Calentar el material a esterilizar hasta la temperatura de esterilización predefinida y mantener esta temperatura durante el tiempo predefinido. Se mantiene accionada la bomba de recirculación de agua en cámara. Se acciona en forma intermitente la válvula de calefacción, la temperatura de cámara se mantiene en el valor predefinido.	Temperatura de esterilizado
		Tiempo de esterilizado
		Presión compensada
Enfriamiento	Enfriar el material esterilizado. Se mantiene accionada la bomba de recirculación de agua en cámara. Se acciona la válvula de enfriamiento de agua en cámara (agua fría a intercambiador de calor), la temperatura de cámara desciende hasta el valor predefinido.	Temperatura de enfriamiento
		Presión compensada.
Descarga de agua	Descargar de la cámara la cantidad de agua necesaria para finalizar el ciclo. Se acciona la válvula de descarga de agua de la cámara, el nivel de agua en cámara desciende hasta alcanzar el valor predefinido.	Nivel de agua
Descarga de presión	Descargar la presión de agua y vapor existentes en la cámara. Se acciona la válvula de venteo de cámara, la presión de cámara desciende hasta alcanzar la presión atmosférica.	Presión de cámara = atmosférica
Fin de ciclo	Descargar el material esterilizado.	Posibilidad de abrir la puerta de descarga.

Gráfico 5: Diagrama del ciclo de esterilización por lluvia de agua sobrecalentada con presión compensada



Empaques y envases aplicables al proceso de esterilización por vapor:

EMPAQUES PARA USO HOSPITALARIO Y PARA INDUSTRIA PRODUCTOS MÉDICOS (1), (3), (6)

Papel blanco plano o crepado uso médico.

Telas no tejidas, 100% sintéticas polipropileno no tejido tricapa (SMS), o con combinación de celulosa y fibras sintéticas.

Bobinas termosellables con papel plano y laminado polipropileno - poliéster.

Bolsas de papel plano termosellables

Blister rígidos polipropileno y papel blanco plano

ENVASES PARA SOLUCIONES PARENTERALES Y PRODUCTOS FARMACÉUTICOS: (3), (6)

Ampollas selladas de vidrio

Frasco ampolla de vidrio borosilicato tipo 1 Pyrex®, ó Kimax®, con sello goma y precinto de aluminio

Container o sachet flexible de PVC

Container o sachet flexible de polietileno alta densidad.

ENVASES PARA INDUSTRIA ALIMENTICIA: (3)

Latas de aluminio

Contenedores rígidos de polipropileno

Contenedores cartón- foil de aluminio

Validación del proceso

Validar es obtener y documentar evidencias que prueben en forma fehaciente que un equipo y/o proceso cumple en forma consistente y repetitiva con criterios de aceptación predeterminados. En la validación de un proceso de esterilización por calor húmedo distinguimos las siguientes etapas en forma secuencial:

Aptitud del equipo:

- Calificación de la Instalación (I.Q.)
- Calificación Operativa (O.Q.)

Calificación de Desempeño (P.Q.):

- Microbiológica
- Física

Confección del Informe Final de Validación

Aptitud del equipo:

Consiste en ejecutar la Calificación de la instalación (IQ) y la Calificación de la operación (OQ)

Calificación de la Instalación (I.Q.)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos de la instalación del equipo y los suministros de planta son los correctos. Se deben cumplir con las especificaciones del fabricante. ⁽⁷⁾

Estos aspectos son:

Características del equipo y sus componentes: Se verifica visualmente para los componentes la correspondencia de: tipo, modelo, número de serie, fabricante, en listado tipo “*check list*”. Las características de la estructura principal del esterilizador deben responder a las necesidades del usuario: dimensiones de cámara, cantidad de puertas, sistema de carga, generador de vapor, compresor de aire, etc.

Software: El software instalado en el equipo, al igual que sus funciones, parámetros iniciales y rangos de programación debe ser el especificado por el fabricante y debe validarse.

Verificación de los suministros: Para cada uno de los suministros debe verificarse: tensión, presión de línea, capacidad instalada, caudal, calidad, válvula, llave de corte, conexión disponible, etc.

Planos y Manuales de servicio y de operación: Los planos de instalación, de cañerías y de circuitos eléctricos deben estar actualizados, disponer de título, código, revisión y fecha de validez. Los planos deben ser contrastados con el equipo y los servicios. Se debe verificar la existencia de manuales de servicio técnico y de operación, y desarrollar procedimientos escritos para la operación y el mantenimiento del equipo.

Calibración de instrumentos: Deben estar calibrados frente a instrumentos patrón, todos los instrumentos de control, de registro, de referencia visual y de seguridad operativa del esterilizador y de todo el equipamiento accesorio.

Ensayo de calidad del vapor: El ensayo de calidad de vapor debe realizarse a partir de muestras tomadas en el punto de uso. El título o saturación del vapor no debe ser menor al 95%. El porcentaje de aire y gases no condensables no debe superar un 3,5 % V/V; el grado de sobrecalentamiento no debe ser superior a 5°C. La metodología para la realización de los ensayos de calidad del vapor puede hallarse en detalle descripta en las normas que regulan la construcción y funcionamiento de equipos esterilizadores por vapor⁽⁴⁾

Calificación operativa (O.Q.)

Es la verificación documentada de que el equipo funciona dentro de los límites o rangos predeterminados cuando se lo opera sin carga, bajo instrucciones de uso.

Para efectuar los ensayos físicos de calificación operativa del esterilizador y para la posterior calificación física de las cargas, se emplea instrumental de validación.

Este instrumental consiste en sensores de temperatura y presión conectados a adquirentes electrónicos de datos (“validadores”) y/o equipos portátiles tipo *data logger*.

Los sensores de temperatura y presión del validador se ingresan a la cámara del esterilizador, a través de una brida / entrada de validación, la que posee un sello hermético. Luego se comienzan a desarrollar las

pruebas del OQ.

Normalmente el OQ comienza con pruebas funcionales (alarmas, enclavamientos, puertas, etc.). A continuación se realiza una prueba de hermeticidad de cámara o "Leak Test" ^{(4), (7)}, y un ensayo de remoción de aire y penetración de vapor o "Bowie Dick Test" ^{(4), (8)}

Todos los instrumentos de validación utilizados deben ser de mayor exactitud que los instrumentos propios del esterilizador y deben estar calibrados. ⁽⁷⁾

Prueba de hermeticidad de cámara (Leak test) ^{(1), (3), (7)}

La existencia de puntos de ingreso de aire no estéril finalizada la etapa de esterilización a través de válvulas, sellos, entradas de validación, burletes o fisuras del esterilizador, representa un peligro potencial de recontaminación de la carga esterilizada, teniendo en cuenta que finalizada la etapa de esterilizado la carga se encuentra aún con humedad y es especialmente susceptible a contaminación.

Se pone a prueba la capacidad de estanqueidad de la cámara sin carga, sometiéndola a una presión absoluta de 70 mbar (vacío profundo), tras lo cual se cierran todas las válvulas. Esta condición se mantiene en forma estática por un lapso de 5 minutos de estabilización más 10 minutos de observación, observando y registrando con los instrumentos de validación la presión de cámara a cada minuto. Una vez cumplido el tiempo programado, el equipo rompe el vacío de cámara por medio de ingreso de aire filtrado.

El aumento de presión dentro de la cámara durante el tiempo de observación del test, no debe exceder de 1,3 mbar / minuto o en total 13 mbar / 10 minutos. ^{(3),(4)}

Test de Bowie- Dick ^{(1), (3), (4), (7), (8)}

El objetivo el test de Bowie Dick es verificar la eficacia del sistema de vacío para remover el aire de la cámara y de diferentes paquetes, prevenir reingreso de aire a través de válvulas y la capacidad de penetración rápida y completa del vapor en un paquete poroso normalizado ⁽⁷⁾, el que se localiza en la posición más desfavorable para la eliminación del aire. El paquete de prueba posee en su interior una hoja impresa con tinta especial sensible al vapor y es sometido a un ciclo con idéntico mecanismo de prevacíos que el empleado para la esterilización de las cargas porosas de rutina, pero sólo con 3,5 minutos de esterilización a 134 °C, ó 15 minutos a 121 °C.

Al finalizar la prueba la hoja sensible o testigo ubicada en el centro del test pack debe haber virado de color íntegramente, en toda su superficie en forma pareja, hasta el tono de color final que indica el fabricante del dispositivo. La presencia en la hoja de prueba de una ó varias zonas más claras en posición central indica que durante el tiempo de esterilizado, fracciones remanentes de aire no fueron removidas correctamente, impidiendo el contacto con el vapor. ^{(1),(3), (4),(6),(8)}

Figura 2: Ensayo o test Bowie Dick.

Ejemplo de Test pack comercial antes del ensayo, con hoja de prueba en su interior



En la Figura 2 se muestra un test pack comercial, y en la Figura 3, la interpretación de resultados correctos / erróneos.

Figura 3: Hoja de prueba interna, contenida en el centro del test pack.



Ensayo de distribución de temperatura: ^{(4), (7)}

Para validar el perfil térmico en cámara vacía, se recomienda efectuar 3 ensayos idénticos y consecutivos de distribución de temperatura. Se utilizan habitualmente 12 sensores de temperatura distribuidos en la cámara sin producto, o 1 sensor cada 100 litros de cámara, pero nunca menos que 5 sensores para cualquier volumen de cámara⁽⁴⁾ y 1 sensor de presión conectado también a cámara.

Los sensores de temperatura se deben distribuir en la cámara, incluyendo puntos críticos como proximidad de puertas, drenaje del condensado, etc.

En estos ensayos el criterio de aceptación ⁽⁴⁾ es que se obtenga lo siguiente, una vez finalizado el tiempo de equilibrio:

- Una temperatura de esterilizado dentro del rango -0 / +3 °C del set point.
- La temperatura en cada punto no debe fluctuar más que +/- 1°C
- La diferencia de temperatura instantánea entre todos los puntos ensayados deber ser ≤ 2 °C.
- La presión de cámara debe fluctuar dentro del rango +/- 5% del valor teórico correspondiente a la curva de vapor saturado a la temperatura del proceso; ésta última determinación es una forma indirecta de medir el grado de sobrecalentamiento del vapor.
- El máximo cambio o variación de presión aceptable en cualquier etapa del ciclo no debe exceder 10 bar/minuto, a fin de preservar la integridad de empaques y producto

Calificación de Desempeño (P.Q.):

Es la verificación documentada de que el equipo, calificado previamente como apto, cuando se lo opera con carga de producto, permite obtener en forma reproducible un producto seguro y eficaz.

En la calificación de desempeño se procede a realizar los ensayos con la cámara cargada con cada uno de los patrones de carga a validar, ó en su defecto con la carga de referencia.^{(4), (7)}

Calificación microbiológica ^{(4), (7)}

Tiene por objeto determinar el tiempo de esterilizado que asegure en todos los puntos de la carga una letalidad suficiente para lograr un SAL de 10⁻⁶.

El SAL para el proceso de esterilización se puede establecer de una de las siguientes maneras: ⁽⁷⁾

- a) Por conocimiento del “Bioburden” del producto.
- b) Por “Overkill”.
- c) Demostrando que durante el “Holding Time” en la etapa de esterilizado, todas las partes del producto fueron expuestas a los valores mínimos para los parámetros del proceso seleccionados de una norma oficial (ej. Farmacopea Nacional).
- d) Asignando al producto el proceso aplicable validado sobre la familia de productos, siempre y cuando el tiempo de equilibrio no sea mayor que el de los productos validados de esa familia.

Cualquiera sea el método microbiológico que se emplee, es necesario determinar previamente el *bioburden* de la carga, o recuento de bacterias mesófilas aerobias totales por unidad de producto, considerándose aceptable cuando el producto no supera una carga biológica de 10^2 - 10^3 UFC/ unidad de producto a esterilizar.

Se resumen a continuación los lineamientos de los métodos a) y b)

a) Enfoque basado en el bioburden del producto. ⁽⁷⁾

El enfoque basado en el bioburden se utiliza exclusivamente en industria farmacéutica y muy rara vez en la industria de productos médicos. Es aplicable sólo en los casos en que el producto es alterable por efecto de la temperatura, debiendo ser sometido a una mínima exposición térmica que garantice un SAL de 10^{-6}

Una posibilidad para ejecutar este enfoque es aplicar el método desarrollado por Pflug y Holcomb (1983) que consiste en la incorporación de inóculos desafío en el producto a esterilizar, en lugar de la utilización convencional de bioindicadores. Los inóculos son suspensiones de un microorganismo de resistencia y población superiores a la biocarga propia del producto, cuya composición, número y resistencia promedio se ha evaluado e investigado exhaustivamente en forma previa.

Un número predeterminado de inóculos se localiza dentro de la carga, en el interior de los productos. A continuación se realizan cinco ensayos con exposición gradual creciente en el tiempo de esterilizado, manteniendo todas las demás variables del ciclo constantes.

Después de cada una de las cinco exposiciones, se procede a cultivar los productos inoculados, evaluando como punto final el desarrollo ó ausencia de crecimiento microbiano. Se determina para cada tiempo de exposición la proporción de los inóculos que no desarrolla luego de la incubación (fracción negativa)

Obtenida la fracción negativa en cada una de las cinco corridas, por utilización de fórmulas se calcula el D (coeficiente de reducción decimal) del inóculo de prueba. Conocido el D, se extrapola el tiempo de exposición al vapor de agua para lograr la reducción de 12 logaritmos de población del inóculo de referencia. Este tiempo consistirá entonces el tiempo de esterilizado para el ciclo productivo.

b.) Enfoque conservador del overkill, método del medio ciclo. ⁽⁷⁾

El objetivo del ensayo es determinar el tiempo de esterilizado que permita en los ciclos productivos asegurar la inactivación de 12 log de un esporulado de referencia con $D_{121,1} \geq 1,5$ minutos, y lograr un SAL de 10^{-6} .

Para ello se colocan los bioindicadores (IB) dentro de la carga, en un número acorde al volumen de la carga; el mismo se indica en la norma de referencia para la validación del proceso ^{(5), (9)} Se recomiendan 12 IB por carga.

Se somete la carga al proceso realizando tres ensayos consecutivos con idéntico tiempo de exposición, debe demostrarse en forma repetitiva la inactivación de todos los bioindicadores *Geobacillus stearothermophilus* con población mínima 1×10^6 y valor $D_{121,1} \geq 1,5$ min a 121°C .

Cumplido el criterio de aceptación, el tiempo de esterilizado para un ciclo se define como el doble de tiempo que el utilizado en los medios ciclos; el mismo asegura una reducción de 12D del esporulado de referencia.

Calificación física

Los sensores de temperatura se colocan dentro de la carga, perforando los empaques. En la validación de cargas líquidas deben colocarse en el interior de los envases, sumergidos en el líquido.

La cantidad de repeticiones de cada ensayo debe ser de un mínimo de tres para demostrar reproducibilidad. ⁽⁷⁾

La cantidad de sensores en cada ensayo de acuerdo al volumen de la carga se detalla en la normativa de referencia. ^{(4), (7)}. Se recomiendan 12 sensores de temperatura en contacto con el producto, ó 1 sensor cada 100 litros de cámara, pero nunca menos que 5 sensores para cualquier volumen de cámara y 1 sensor de presión. ⁽⁴⁾

Ensayo de penetración de temperatura:

En los ensayos de penetración de temperatura el criterio de aceptación es obtener lo siguiente, una vez finalizado el tiempo de equilibrio ⁽⁴⁾:

- Una temperatura en esterilizado dentro del rango -0 / +3 °C del set point.
- La temperatura en cada punto no debe fluctuar más que +/- 1, 5 °C
- La diferencia de temperatura instantánea entre todos los puntos ensayados deber ser ≤ 2 °C.
- La presión de cámara debe fluctuar dentro del rango +/- 5% del valor teórico correspondiente a la curva de vapor saturado a la temperatura del proceso.
- El máximo cambio o variación de presión aceptable en cualquier parte del ciclo no debe exceder 10 bar/minuto, a fin de preservar la integridad de empaques y producto ⁽⁴⁾
- Se procede con el adquisidor de datos, a calcular el valor F0 (letalidad microbiológica expresada matemáticamente). Generalmente se acepta F0 en el punto más frío (F0 mínimo) de 12 minutos.

Informe final de validación:

El informe debe reunir o recopilar toda la documentación obtenida en la validación, en forma ordenada, detallada y secuencial. ⁽⁷⁾ El mismo debe incluir:

- Especificaciones del esterilizador y del equipamiento de validación.
- Registros de calibración de instrumentos de validación.
- Registros físicos de todos los ensayos del OQ.
- Detalle de los productos, envases, diagrama de cargas utilizadas.
- Resultados de las pruebas biológicas del PQ.
- Registros físicos de todos los ensayos del PQ.
- Hoja de especificaciones para el proceso, con el valor y rango permitido para cada variable física del proceso.
- Registros de firmas responsables.

Revalidación:

Se debe revalidar cada vez que haya cambios en el equipamiento, proceso ó producto; cambios en los requerimientos regulatorios; ó debido al vencimiento del tiempo transcurrido desde la última validación. Este período no está especificado en normas, lo recomendable es realizar una revalidación periódica cada 6 meses, ó mínimamente en forma anual.

Si no se han realizado cambios críticos que requieran una recalificación de las instalaciones, la revalidación se

aplicará exclusivamente a la Calificación de desempeño.

Es recomendable comparar los registros de la revalidación con los de la validación original, manteniendo el mismo formato. ⁽⁷⁾

Monitoreo y control de ciclos de rutina

MONITOREO PERIÓDICO DEL EQUIPO ESTERILIZADOR

Además de la revalidación periódica del esterilizador y de la calidad del suministro de vapor; se debe asegurar diariamente el correcto funcionamiento de los ciclos de remoción de aire por prevacíos mediante la realización de un ciclo automático de Bowie Dick. ^{(3), (4), (5), (7)}

Semanalmente ó preferentemente con frecuencia diaria debe efectuarse una prueba de fuga en cámara ó "leak test" ^{(3), (4)}

MONITOREO DE PARÁMETROS FÍSICOS:

Los parámetros físicos a monitorear y registrar para cada proceso y cada lote de producto esterilizado son: ^{(6), (7)}

Nivel de vacío en los pulsos de remoción del aire

Presión de los pulsos de vapor en la remoción del aire

Temperatura de esterilizado

Tiempo de esterilizado

Presión de cámara en esterilizado

Nivel de vacío en el secado

Tiempo de secado

MONITOREO QUÍMICO:

Se utiliza un control químico externo (clase I Norma ISO 11.140), bajo la forma de cintas o etiquetas autoadhesivas, ^{(6), (9)} en cada empaque primario, sólo con fines de diferenciar visualmente los productos que atravesaron un ciclo de esterilización respecto de los no procesados.

La utilización de controles multiparámetro e integradores (clases IV y V de la citada norma) ^{(6), (9)} se reserva para control interno de cada paquete, con localización interna en el punto de más difícil acceso al vapor de agua.

Se debe verificar un cambio neto al punto final especificado por el fabricante finalizado el ciclo de esterilización, en todos los indicadores químicos. ^{(6), (9)}

MONITOREO BIOLÓGICO:

Para el monitoreo de los procesos de esterilización por calor húmedo se emplean de rutina esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ⁽¹⁰⁾

Los bioindicadores para el monitoreo de rutina de esterilización de cargas sólidas porosas y cargas sólidas huecas se colocan en productos simulados (PCD'S), en posiciones comprometidas para la penetración del vapor. ^{(4), (6)}

Pueden utilizarse ^{(3), (10)}:

- ✓ tiras comerciales de papel de filtro inoculadas con esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, diseñadas para posterior transferencia aséptica en medio de cultivo estéril (incubación y lectura 7 días)
- ✓ dispositivos autocontenidos conteniendo la tira de papel de filtro inoculada con el IB y una ampolla de vidrio

frágil sellada hermética con medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo del dispositivo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 48 horas)

Para el monitoreo de la esterilización de soluciones parenterales en envases flexibles y líquidos en envases rígidos, deben utilizarse ⁽³⁾:

- ✓ ampollas selladas de vidrio conteniendo la suspensión del IB en medio de cultivo estéril, para posterior cultivo directo sin necesidad de transferencia aséptica (incubación y lectura 7 días)

Finalizado el período de incubación a 55-60 °C ⁽⁶⁾, se interpretan los resultados como obtención de desarrollo (resultado positivo) o ausencia de desarrollo (resultado negativo) ⁽¹⁰⁾

En la esterilización de cargas hospitalarias, se recomienda una frecuencia semanal de utilización, ó preferentemente diaria y obligatoriedad de monitoreo biológico en los ciclos de esterilización de cargas con implantes ^{(5), (6)}

En la industria de productos médicos e industria farmacéutica, la utilización de IB en los ciclos productivos no está indicada obligatoriamente, siendo aún requisito por protocolo interno del laboratorio la realización de test de esterilidad para proceder a la aprobación y liberación del lote ⁽³⁾ (ver USP *General Chapters* <71> *Sterility tests*)

Liberación de la carga ^{(6), (7)}

Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos.

Cambio al punto final de los indicadores químicos.

Inactivación de todos los B.I (si los mismos fueron utilizados).

Test de esterilidad de muestras representativas del lote con resultado negativo (si el protocolo interno del laboratorio exige este requisito).

Aplicación en industria e instituciones de salud, incompatibilidades y limitaciones del método

El vapor de agua saturado bajo presión es el agente esterilizante de elección en todo el mundo en centros para el cuidado de la salud, laboratorios de microbiología y en la producción industrial de fármacos y productos médicos estériles ^{(1),(2)} excepto cuando la penetración del vapor ó la temperatura del proceso generen daños o deterioros al producto. La utilización de metodologías alternativas sólo se justifica para aquellos materiales susceptibles de dañarse por acción del calor o de la humedad. ⁽²⁾

Una de las consideraciones a tener en cuenta es la relación entre la velocidad de degradación del material y la velocidad de inactivación biológica. ⁽¹⁾ Varios estudios realizados sobre el daño producido en textiles y gomas bajo diferentes condiciones operativas (Medical Research Council, 1964; Henry, 1964; Fallon and Payne, 1963) y sobre degradación de nutrientes (Stumbo, 1973) demostraron que cortos tiempos y altas temperaturas tuvieron menor efecto deletéreo para una inactivación bacteriana equivalente ⁽¹⁾. Es conocido el sufrimiento de las proteínas bajo tratamiento con calor húmedo y la caramelización de los carbohidratos, hecho a tener en cuenta en el diseño del proceso de esterilización de soluciones parenterales. ⁽¹⁾

La pérdida del valor nutricional debida al tratamiento térmico de alimentos ha quedado minimizada con el advenimiento de la técnicas de ultra-alta-temperatura (UHT), en la que los productos líquidos o semisólidos a esterilizar son sometidos a temperaturas ≥ 132 °C en proceso continuo durante un tiempo corto de exposición, y enfriados inmediatamente utilizando intercambiadores de calor, resultando en mínimos cambios organolépticos y casi nula degradación catabólica de nutrientes. ⁽¹⁾

Compatibilidades:^{(2),(3)}

En referencia a los materiales constitutivos de productos a esterilizar por calor húmedo podemos mencionar: ⁽³⁾ Teflón / PTFE, silicona fluida, goma de silicona, gomas naturales, policarbonato, polisulfona, polipropileno,

acrílicos, algodón y algodón-poliéster, cerámicas, vidrio, madera, acero inoxidable, titanio, aluminio, soluciones con principios activos ó nutricionales con base acuosa, geles acuosos.

Incompatibilidades: ^{(2),(3)}

Polvos de naturaleza mineral ú orgánica, vaselinas, productos alimenticios grasos o no emulsificables, principios activos degradables por la temperatura del proceso.

En referencia al campo de aplicación de la esterilización por calor húmedo destacamos: ^{(1),(3)}

Industria farmacéutica: inyectables monodosis, inyectables multidosis, soluciones parenterales y no parenterales de gran volumen; insumos utilizados en áreas limpias

Industria de productos médicos: prótesis vasculares, prótesis cardíacas, ropa quirúrgica, gasa, envases de polipropileno para recolección de muestras biológicas, filtros para hemodiálisis.

Instituciones de salud: instrumental quirúrgico, piezas de mano de equipos médicos, material de curación, textiles naturales y sintéticos, material de terapia respiratoria reutilizable.

Laboratorio de microbiología: medios de cultivo, soluciones buffers, inactivación de muestras contaminadas, esterilización de instrumentos utilizados en la manipulación y análisis de muestras biológicas.

Industria alimenticia: conservas, leche y jugos de fruta.

Bibliografía:

1. Seymour S. Block: *Desinfection, Sterilization and Preservation*, fourth ed., Lea & Febiger, Part IV, 29. p.527, U.K., 1991
2. Gardner, J.F. and Peel, M.M.: *Introduction to Sterilization and Desinfection: Sterilization by gaseous chemicals*. Edimburgh, Churchill Livingstone, 1991.
3. Alder, V. G and Simpson, R. in: Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: *Principles and Practice of Desinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd edition. Chapter 18: *Heat Sterilization*, p.499. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1992.
4. EN 285:1997: *Sterilization- Steam sterilizers- Large sterilizers*. 1997.
5. Resolución 1547:2007: *Guía de procedimientos y Métodos de Esterilización y Desinfección para Establecimientos de salud públicos y privados*, p.17-18. Ministerio de Salud, 2007.
6. ANSI/ AAMI ST79:2006: *Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities*; Arlington, Virginia; 2006.
7. ISO 17665-1: 2006: *Sterilization of health care products- Moist heat- Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*, 2006.
8. ISO 11140-3: 2005: *Sterilization of Health Care products. Chemical indicators. Part 3: Class 2 indicator systems for use in the Bowie Dick test steam penetration test*; 2nd ed, 2005.
9. ISO 11140-1: 2005: *Sterilization of Health Care products. Chemical indicators. Part 1: General*; 2nd ed, 2005.
10. ISO 11138-3: 2006: *Sterilization of Health Care products: Biological Indicators. Part 3: B.I. for moist heat sterilization processes*, 2006.

Esterilización con Radiaciones ionizantes

Celina Horak

- *Fundamentos del método*
- *Instalaciones de irradiación*
- *Efecto de las radiaciones sobre los microorganismos*
- *Efecto de las radiaciones en los materiales*
- *Validación del proceso de irradiación*
- *Monitoreo y control de rutina*
- *Conclusiones sobre el método*
- *Bibliografía*

Fundamentos del método

Las radiaciones ionizantes se utilizan para tratar una gran diversidad de productos con distintos objetivos. Entre las principales aplicaciones, se puede mencionar la *esterilización* de productos de uso médico, de tejidos biológicos para implante, productos odontológicos, productos farmacéuticos, envases y la *descontaminación* de materia prima, cosméticos y alimentos.

La esterilización por irradiación de productos médicos fue iniciada industrialmente por Ethicon en el año 1956 en EE.UU, con la irradiación de hilos de sutura. En Argentina se estableció la primer Planta de Irradiación semi-industrial multipropósito en 1970. Actualmente en el mundo hay más de 170 plantas industriales de irradiación gamma destinadas a esterilización.

Con el fin de asegurar la eficacia del proceso de esterilización, desde la década de 1960 se comenzaron a establecer guías para definir la dosis de esterilización por irradiación en base a diversos criterios, tales como:

- basarse en una curva de inactivación del organismo más resistente a la radiación aislado hasta entonces (esporas de *Bacillus sphaericus* C1-A) y en las condiciones más adversas;
- mediante el uso de indicadores biológicos (esporas de *Bacillus pumilus* E601) durante el proceso de esterilización;
- y en la década de los 80 se comenzó a usar la información derivada de la inactivación de la población microbiana aislada de productos médicos en su estado natural. Se diseñó un modelo probabilístico para la inactivación de la población microbiana, en base a los datos experimentales. Hoy en día se utilizan las Normas ISO 11137 [1,2,3], que utilizan en sus metodologías dicho diseño probabilístico.

Dado que el proceso de irradiación es una etapa del proceso de fabricación de un producto, se deben aplicar las buenas prácticas de irradiación, que incluyen en una etapa inicial la validación del proceso; una vez cumplimentada esta etapa, el producto será procesado –y controlado- en forma rutinaria en las mismas condiciones establecidas en la validación. Luego se deberán realizar verificaciones periódicas del

mantenimiento de la validación.

El proceso consiste en exponer los productos y/o materia prima frente a la radiación durante el tiempo necesario para que los productos absorban la energía suficiente para alcanzar el objetivo buscado. Esta energía transferida por la radiación incidente al material irradiado –*dosis absorbida*– es la responsable de producir en el material irradiado iones y especies excitadas y por lo tanto, modificaciones químicas y biológicas de interés. Es por ello que la dosis es la magnitud de principal interés.

Dicha dosis absorbida (cuya unidad es el Gray, en el sistema internacional), equivale a la energía absorbida por unidad de masa de producto (Joule /kg):

$$D \text{ (Gy)} = \frac{E \text{ (Joule)}}{m \text{ (kg)}}$$

La *dosimetría* es la herramienta que se utiliza para medir la dosis absorbida por el producto. Además es utilizada para determinar el modelo de distribución de dosis en el producto empacado y controlar el proceso de irradiación de rutina.

La dosimetría se lleva a cabo mediante un sistema dosimétrico, que consiste de:

- Dosímetro físico o químico (elemento que sufre un cambio inducido específicamente por la irradiación, y que permite que sea detectable, estable y reproducible)
- Instrumento que mide el efecto inducido en el dosímetro
- Estándares de referencia

El sistema dosimétrico debe asegurar la Medición de la dosis absorbida y garantizar que la respuesta dosimétrica sea reproducible y cuantificable

Para garantizar la medición de la dosis, cada laboratorio dosimétrico calibra su sistema dosimétrico con un laboratorio de referencia secundaria (nacional o regional) los que a su vez calibran sus sistemas contra laboratorios primarios.

En Argentina el laboratorio secundario de referencia es el Laboratorio de Dosimetría de altas Dosis de la Comisión Nacional de Energía Atómica, quien calibra a su vez su sistema contra el *National Physical Laboratory* (NPL) de Reino Unido.

Instalaciones de irradiación

Existen distintas categorías de instalaciones de irradiación, de acuerdo al tipo de fuente (radionucleídos o máquinas), aplicación (esterilización, irradiación de alimentos, etc), productos (específico o multipropósito), modalidad de irradiación (continuo o por lotes), sistema de transporte (estático, dinámico, simple o multipasadas), etc.

Las instalaciones de irradiación están constituidas mínimamente por:

- Fuente de radiación (^{60}Co , ^{137}Cs , aceleradores de electrones, Rx)
- Recinto de irradiación con blindaje adecuado
- Sistema de transporte de producto
- Depósito diferenciado para productos irradiados y no irradiados
- Sistemas auxiliares
- Sistemas de seguridad y control
- Sistema de control de proceso

Irradiadores gamma: utilizan principalmente fuentes selladas de ^{60}Co , un radionucleído artificial producido en un reactor nuclear. El decaimiento natural del mismo emite dos fotones gamma con energías de 1,17 MeV and 1.33

MeV. Las fuentes –incluidas en varillas o lápices doblemente encapsuladas en acero inoxidable- se colocan en una estructura portafuentes (forma de placa o cilindro).

Se definen cuatro categorías de irradiadores basadas en las características de accesibilidad y a la modalidad de blindaje:

- Categoría I: autoblandada, almacenaje de la fuente en seco (ej Gammacell). No es posible el acceso de personas a la fuente ni al área donde se realiza el proceso en ningún momento.
- Categoría II: panorámica, almacenaje de fuente en seco. No se puede acceder al área donde se realiza el proceso cuando la fuente está expuesta.
- Categoría III: autoblandada, almacenaje de la fuente en agua. La fuente está blindada –por agua- en todo momento, por lo que el acceso al área donde se realiza el proceso no es físicamente posible.
- Categoría IV: panorámica, almacenaje de la fuente en agua. No se puede acceder al área donde se realiza el proceso cuando la fuente está expuesta, y cuando no lo está, permanece blindada por agua.

En Argentina se dispone de irradiadores Categoría I y IV, cuyos esquemas se muestran en la Figura 1:

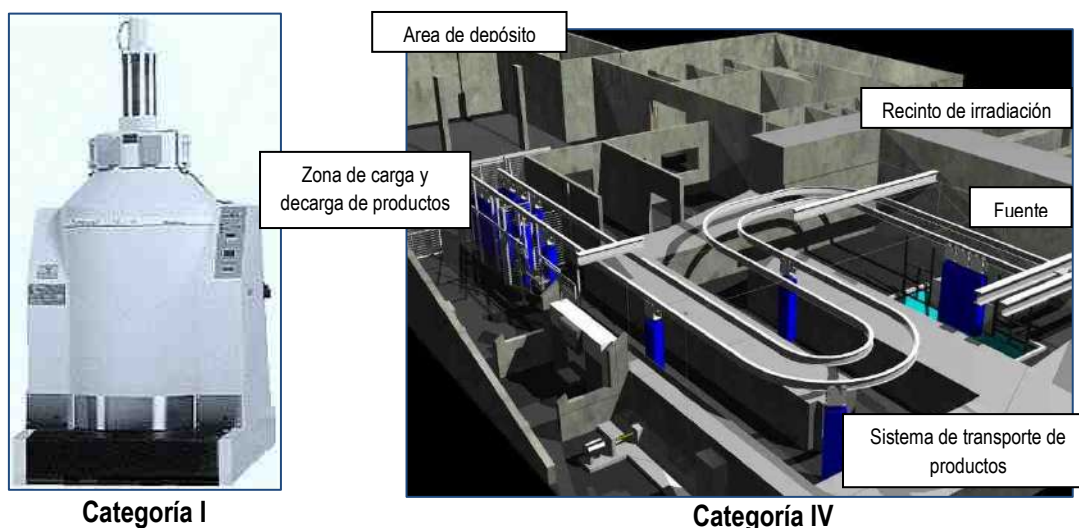


Figura 1: ejemplos de Irradiadores Categoría I (Gammacel 220, Nordion, CA) y Categoría IV (esquema de diseño de la Planta Semi-Industrial de CNEA, Ezeiza)

El irradiador categoría I es autoblandado, lo que permite estar en el ambiente de un laboratorio. La celda de irradiación es pequeña, por lo que su uso está restringido a volúmenes de irradiación chicos, encontrados frecuentemente en investigación y desarrollo.

Las instalaciones de irradiación categoría IV de Argentina son multipropósito (tratan una gran diversidad de productos). Las mismas cuentan con una *fente* de ^{60}Co (Actividad nominal máxima para la cual fueron construidas: 1.000.000Ci), la cual está sumergida – cuando no está expuesta - en una pileta con agua desmineralizada con profundidad suficiente como para proteger al personal que ingresa al área de irradiación. Cuando se realiza el proceso dicha fuente es izada mediante un mecanismo de movimiento adecuado. El *recinto de irradiación* es el local de la instalación destinado a la irradiación, con suficiente blindaje para limitar adecuadamente la dosis en el interior del mismo, de modo de proteger tanto al personal que trabaja en la instalación como a miembros del público. El material que lo constituye y su espesor dependen de las características de la fuente. El producto a irradiar es colocado en *sistemas de transporte*, los cuales pueden ser de movimiento continuo o por tandas, simple o multipasadas frente a la fuente, o sistemas estáticos. Las características y capacidad del sistema de transporte son diseñadas de acuerdo al tipo y dimensiones del producto a irradiar. Generalmente los irradiadores se diferencian entre sí por el tipo de fuente y la geometría fuente- producto. La configuración debe ser tal que se optimice la uniformidad de dosis y la eficiencia del proceso. Se define el factor de eficiencia como la cantidad de energía ionizante absorbida en el producto por

energía de radiación emitida desde la fuente.

En irradiadores gamma, por lo general, la uniformidad de dosis y la eficiencia son antagonistas. Por ejemplo, aumentando la distancia fuente-producto aumenta la uniformidad de dosis pero reduce la eficiencia. En el caso en que el producto sobrepase la fuente, la eficiencia es más alta que en el caso que la fuente sobrepase al producto, pero la uniformidad de dosis no es buena, por lo que en esta configuración es necesario realizar transferencia vertical del producto.

Máquinas generadoras de haces de electrones: La radiación primaria de los haces de electrones provienen de electrones acelerados producidos en máquinas, los cuales a través de arreglos adecuados del equipo, son organizados en un haz unidireccional dirigido hacia el producto. Los electrones emitidos por los aceleradores tienen un espectro de energía relativamente cercano (energías de hasta 10 MeV, dependiendo de la potencia de la máquina), el cual define la penetración en el medio absorbente. La uniformidad de dosis sólo puede lograrse mediante la correcta armonización de la frecuencia de barrido del haz, grado de repeticiones y velocidad del transportador.

Máquinas generadoras de rayos X: Los rayos X son obtenidos por la conversión de la energía de los electrones en la línea de salida del acelerador de electrones con la ayuda de un blanco para rayos X. Cuando los electrones son frenados por este blanco, generan los rayos X. A altas energías los rayos X son mayormente dirigidos hacia delante en la dirección de los electrones incidentes. En contraste a las fuentes de radionucleídos, los irradiadores de rayos X emiten un espectro de ancha banda, consistente en fotones de numerosas energías. En ciertos diseños la porción del espectro de baja energía puede ser filtrada, usando sólo las altas energías (energías de 0,2 a 5 MeV). Normalmente las máquinas generadoras de haces de electrones y de rayos X están provistas de un barredor de haz o de un dispositivo de dispersión a fin de conseguir una distribución uniforme de la radiación sobre la superficie del producto. Para lograr un proceso uniforme se deben ajustar el sistema de movimiento del producto, el ancho, la velocidad de barrido y la frecuencia de los impulsos del haz.

En Argentina, es la AUTORIDAD REGULATORIA NUCLEAR (ARN) el organismo que regula la actividad nuclear y tiene a su cargo el otorgamiento de autorizaciones y licencias, así como la fiscalización de cumplimiento de las normas y requerimiento que de ella deriven.

Efecto de las radiaciones sobre los microorganismos

La interacción de la radiación con la materia depende del tipo de radiación y su energía, la composición, estado físico y temperatura del material absorbente, y otros factores tales como la velocidad en que se entrega la energía y las condiciones ambientales.

Hay tres etapas fundamentales en el proceso de interacción de la radiación ionizante con el material absorbente (incluidos los microorganismos):

- 1) Proceso físico: involucra la interacción de la radiación con la materia, produciendo ionización y excitación;
- 2) Proceso químico: involucra los cambios químicos que se producen como consecuencia de las especies moleculares formadas en el proceso físico, que tienden a reaccionar en cadena con las moléculas vecinas. Dichas especies altamente reactivas van a seguir reaccionando hasta estabilizarse; el tiempo que transcurre desde la transferencia de energía al absorbente hasta la estabilidad de las especies moleculares es del orden de 10^{-3} segundos. Dicha cadena de reacciones será mayor si las especies moleculares pueden difundir en el medio (por ejemplo si el absorbente está en estado líquido) o quedarán limitadas si el medio no lo permite (por ejemplo, si el absorbente está en estado sólido).
- 3) Proceso biológico: involucra los cambios químicos producidos en los componentes celulares, los cuales pueden tener consecuencias en las actividades de la célula y, dependiendo de la seriedad del daño, la muerte del organismo.

A su vez, hay dos formas en que se producen las modificaciones, mediante el *efecto directo*, relacionado con el proceso físico de interacción de la radiación con el blanco de interés (ionización y excitación) e *indirecto*, especies moleculares formadas en el entorno y que van a interactuar con el blanco de interés afectándolo de

alguna manera.

Acción sobre la molécula de ADN

El efecto letal de la radiación sobre las células es atribuible, en principio, a la deposición de la energía (efecto directo) en estructuras críticas o blancos.

Se han considerado los siguientes mecanismos posibles de acción de la radiación sobre la célula microbiana:

- ♦ Cambios en la estructura y composición del ADN celular, los que pueden afectar el normal funcionamiento celular, incluyendo la reproducción celular.
- ♦ Alteración de la membrana celular. Afectan su función de transportar sustancias críticas para la actividad celular y el de la replicación del ADN (muchas de las enzimas requeridas para reparar el ADN están localizadas en la membrana).
- ♦ Efectos sobre los procesos de síntesis, particularmente de las moléculas de ADN y ARN.
- ♦ Efectos sobre enzimas.
- ♦ Efectos sobre el metabolismo energético a través de la reducción de la fosforilación.

De todos estos cambios, los considerados de mayor relevancia son los del ADN celular, debido al rol que juega en la división celular, la presencia de una sola molécula de ADN por célula, a su gran tamaño en comparación con otras moléculas de la célula y a su complejidad estructural.

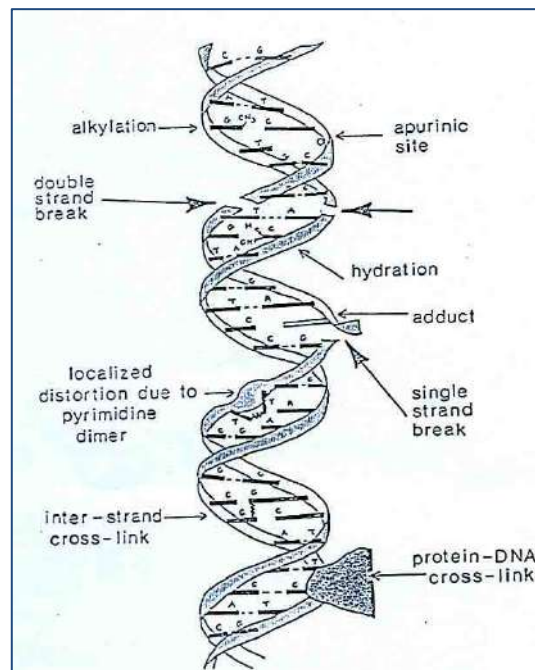


Figura 1: Representación esquemática de las alteraciones radioinducidas en la doble cadena del ADN.

Algunas células tienen capacidad intrínseca de reparación del daño celular, resultando ellas tener mayor resistencia a la radiación. Las bacterias que son capaces de reparar rupturas de doble cadena de ADN son más resistentes que aquellas que reparan solamente la ruptura de una sola cadena.

La dosis letal varía con el organismo y disminuye con el incremento de la complejidad y tamaño del organismo.

En general, la resistencia que los organismos presentan a la radiación tiene el siguiente orden:

virus > esporas bacterianas > levaduras > bacterias Gram positivas > hongos > bacterias Gram negativas.

El efecto de la radiación se produce en las células también mediante *acción directa e indirecta* (Figura 2). En vista de esto, los factores ambientales pueden cambiar radicalmente el efecto de la radiación.

En los sistemas biológicos la influencia de la acción indirecta de las radiaciones ionizantes pueden traducirse en diferentes efectos, por ejemplo se observa disminución de la resistencia de un organismo al aumentar la temperatura (efecto sinérgico) o una mayor resistencia cuando se mantiene congelado el sistema durante la irradiación. En este último caso la acción indirecta es minimizada, ya que las especies moleculares formadas no pueden migrar. Asimismo, cuando se irradia un sistema biológico en presencia de sustancias que tienen una alta reactividad con los radicales libres, se traduce en un efecto radioprotector (por ejemplo, un protector de la acción indirecta de los radicales hidroxilos formados en la radiólisis del agua es la glicerina).

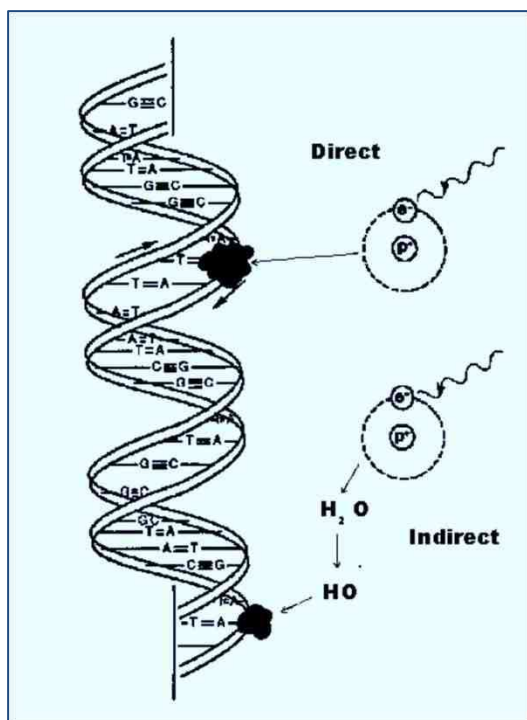


Figura 2:

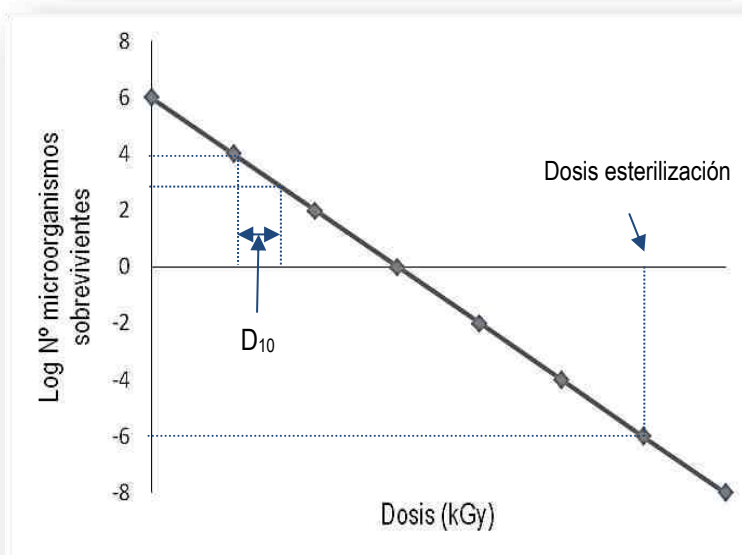
Efecto directo: resulta de la energía absorbida directamente por el ADN

Efecto indirecto: es el resultante de la absorción de la energía en el medio, y la difusión de las especies moleculares formadas en ese entorno que van a reaccionar con el ADN

Curvas de inactivación:

Si se irradia una población de células acondicionadas en un determinado medio con dosis crecientes y se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en función de la dosis se obtiene una curva de cinética de primer orden con pendiente negativa. La pendiente de la curva refleja la sensibilidad del microorganismo a la radiación, en las condiciones de tratamiento.

Figura 3: Curva de inactivación



Ecuación de la curva:

$$\text{Log } N = \text{log } N_0 - k D,$$

Donde $k = 1/D_{10}$

$$D_{10} = 1/k$$

El valor inverso de la pendiente de la curva de inactivación es el D_{10} , que se puede calcular experimentalmente, a partir de la curva de inactivación (Figura 3).

El valor D_{10} se define como la dosis necesaria para reducir el 90% de una población homogénea de

microorganismos, en un entorno definido (expresado en Gray o kGy).

En los siguientes gráficos, Figuras 4 y 5, se puede observar la dependencia de la dosis de esterilización con el número inicial de microorganismos (carga microbiana en el producto) y del tipo de microorganismos o condición de irradiación.

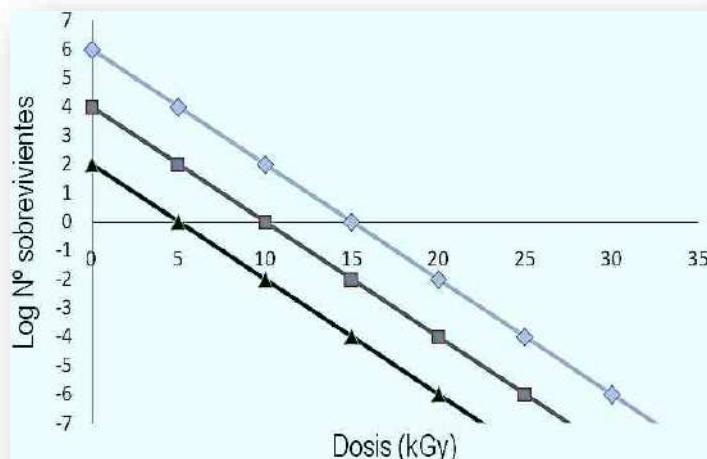
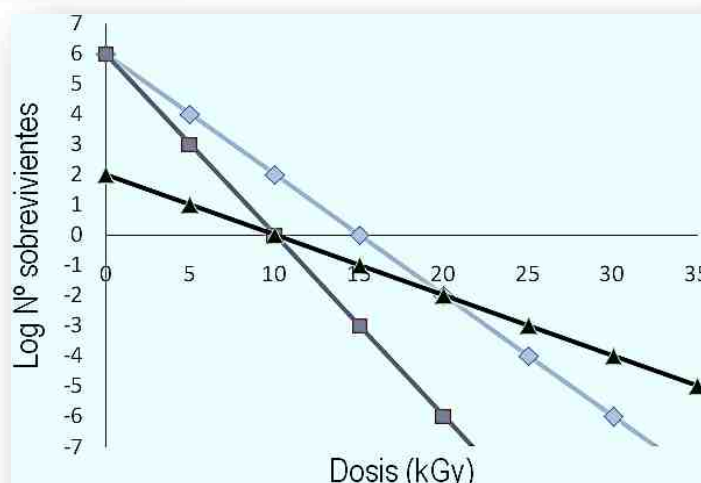


Figura 4: Curvas correspondientes a diferente carga microbiana inicial pertenecientes a un mismo tipo de microorganismo irradiado en la misma condición ambiental.

Figura 5: Curvas correspondientes a diferentes microorganismos o a un mismo microorganismo pero en diferentes condiciones de conservación e irradiación (por ejemplo, congelado, deshidratado, en solución acuosa, etc.)



Efectos de la radiación en los materiales

En la irradiación con radiación ionizante, sea radiación gamma o haces de electrones, las reacciones se producen a nivel de electrones orbitales dando lugar a reacciones químicas cuando la energía absorbida no puede ser disipada por el material antes de llegar a la ruptura de enlaces.

En materiales como los **metales**, los niveles de dosis empleados en los procesos de esterilización no provocan reacciones químicas ya que por el tipo de uniones que los constituyen la energía se disipa fácilmente como calor o energía cinética.

Los **vidrios** también tienen estructuras que permiten la disipación de la energía, en este caso la coloración es un resultado habitual de la irradiación porque los electrones separados de sus órbitas pueden quedar atrapados en fallas de la estructura del vidrio generando centros de color. En general se produce un color ámbar o caramelo, según la dosis absorbida y el matiz varía según la composición del vidrio. Este efecto en vidrios es utilizado en la modificación de colores de piedras semipreciosas y, en algunos países, de perlas cultivadas. Desde el punto de vista del proceso de radioesterilización, la coloración sólo sería un impedimento en el caso de requerirse transparencia total y ausencia de color. El fenómeno es reversible, a medida que decae la excitación de los electrones el vidrio retorna a su color inicial en un proceso que se puede acelerar por calentamiento. En cuanto a

otras propiedades, no se detectan cambios para los niveles de dosis considerados.

El efecto de la radiación para un mismo **polímero** genérico varía con las condiciones de la irradiación, la geometría del producto, la historia térmica en el procesado del producto (que da lugar a distintos tipos morfológicos o de cristalinidad), y los aditivos incluidos en el polímero. La presencia de estabilizantes y cargas inertes puede mejorar significativamente la tolerancia a la radiación de muchos plásticos. Se utilizan por ejemplo derivados de ácidos grasos de Ca, Mg, Zn o Ba; aminas o fenoles sustituidos; compuestos organometálicos del tipo octil-Sn; ésteres del ácido tiodipropánico; derivados de fosfitos.

El problema de la estabilización es particularmente importante en los casos del **polipropileno** y del **PVC** por tratarse de materiales muy empleados en productos médicos y envases y que, por diferentes razones, están en el umbral de utilización cuando se esteriliza por radiaciones.

Por otra parte, distintas propiedades se alteran en muy diferente grado, por esto es importante determinar al comienzo del proceso cuáles son las propiedades que afectan críticamente el desempeño del producto y qué grado de alteración es aceptable.

Los principales efectos en las propiedades físicas de polímeros sometidos a irradiación son: *entrecruzamiento*, cuando predomina la ruptura de uniones de grupos de las cadenas laterales con formación de nuevos enlaces laterales, y la *degradación*, cuando predomina la ruptura de uniones de las cadenas principales. En la Tabla 1 se resume el efecto de la radiación en las propiedades físicas.

Tabla 1. Efecto de la radiación en las propiedades físicas.

	Peso Molecular	Flexibilidad	Solubilidad	Fusibilidad
Entrecruzamiento	Aumenta	Disminuye	Disminuye	Disminuye
Degradación	Disminuye	Disminuye	Aumenta	Aumenta

Existen diversas tablas de radioresistencia de polímeros [7] que normalmente presentan la dosis de tolerancia. Estos valores deben tomarse sólo a título indicativo ya que han sido determinados para alguna propiedad particular, en condiciones de irradiación que pueden ser diferentes de las de interés. Ver Tabla 2.

De acuerdo a la funcionalidad que debe cumplir el polímero en el producto, se pueden realizar distintos ensayos [8], por ejemplo:

- Para exigencia mecánica: Materiales flexibles: tracción, flexión o punción, según la geometría de las muestras ; y Materiales rígidos: flexión, compresión
- Para coloración: visual contra testigo, medición de color, espectrometría
- Químicos: según metodología de control del fabricante

Tabla 2. Niveles de tolerancia a la radiación de algunos polímeros usados en productos médicos, clasificados de acuerdo a sus propiedades y usos finales

Material	Nivel de tolerancia (kGy)
Elastómeros (aquellos que se deforman al someterlos a un esfuerzo, pero recuperan su forma inicial)	
Goma butilo	50
Goma natural	100
Acrílico	50 – 200
Neoprene	200
Siliconas	50 - 100
Termoestables (presentan muchos entrecruzamientos en su estructura molecular)	
Poliésteres	10 – 1.000
Epoxis	1.000
Fenólicos	50.000
Poliuretanos	100 – 1.000
Termoplásticos (presentan pocos o ningún entrecruzamiento en su estructura molecular)	
ABS (acrilonitrilo/butadieno/estireno)	1.000
PET (poliéster aromático)	1.000
Papel, fibras corrugadas	100 - 200
Celulosa, acetato, butirato	50
PTFE (Teflon)	5
Poliamidas (Nylon)	50 – 10.000
Policarbonato	1.000
Poliétileno (todas las densidades)	1.000
Poliamidas	10.000
Poliestireno	10.000
Polisulfona	10.000
Polipropileno estabilizado	20 - 60
PVC	100

Validación del proceso de irradiación

Cada fabricante deberá incluir el proceso de esterilización en su programa de producción del producto médico estéril, cumpliendo con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Fabricación. El fabricante del producto es responsable de la calidad del mismo, incluyendo la selección de la dosis apropiada de esterilización y de la esterilidad del producto final. Cabe destacar que las instalaciones prestadoras del servicio son responsables de entregar la dosis de irradiación solicitada, no del objetivo buscado con dicha irradiación.

Para asegurar la calidad del producto esterilizado, se debe validar el proceso de irradiación, para lo cual se pueden seguir los lineamientos de la norma ISO 11137:2006 para Esterilización de productos para el cuidado de la salud – Requerimientos para validación y control de rutina – Esterilización por radiación.

La Norma incluye los siguientes elementos:

1. Calificación del producto
2. Calificación de la instalación
3. Calificación de Operación
4. Calificación de Performance
5. Verificación y aprobación de los elementos anteriores
6. Mantenimiento de la validación

1. Calificación del producto:

El objetivo es determinar las especificaciones de dosis del proceso: la dosis mínima para cumplir con el objetivo y la dosis máxima compatible. *Esta etapa es responsabilidad del fabricante*, quien lo puede llevar a cabo o tercerizarlo en laboratorios calificados.

1.1. Establecimiento de la dosis de esterilización

En la Resol. N° 255/94 [4] del Ministerio de Salud y Acción Social se establece, las condiciones para los procedimientos de esterilización. Para cumplimentar con los requerimientos que establece esta norma en lo que respecta a asegurar que un producto alcance un nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6} , se debe determinar la dosis mínima del proceso de esterilización para alcanzar tal objetivo. Para ello se debe recurrir a métodos validados.

Métodos de determinación de la dosis de esterilización

Los métodos para la determinación de la dosis de esterilización derivan del modelo de inactivación de la población microbiana del producto en su estado natural cuando es expuesta a la irradiación.

Estos métodos están basados sobre el modelo probabilístico constituido por una mezcla de varias especies microbianas, y donde la probabilidad que un producto en particular sea estéril (es decir que alcanza el nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6}) después de haberse expuesto a una dada dosis de irradiación, está definido en términos del número inicial de microorganismos presentes en la unidad de producto previo a la irradiación y de sus valores de D_{10} .

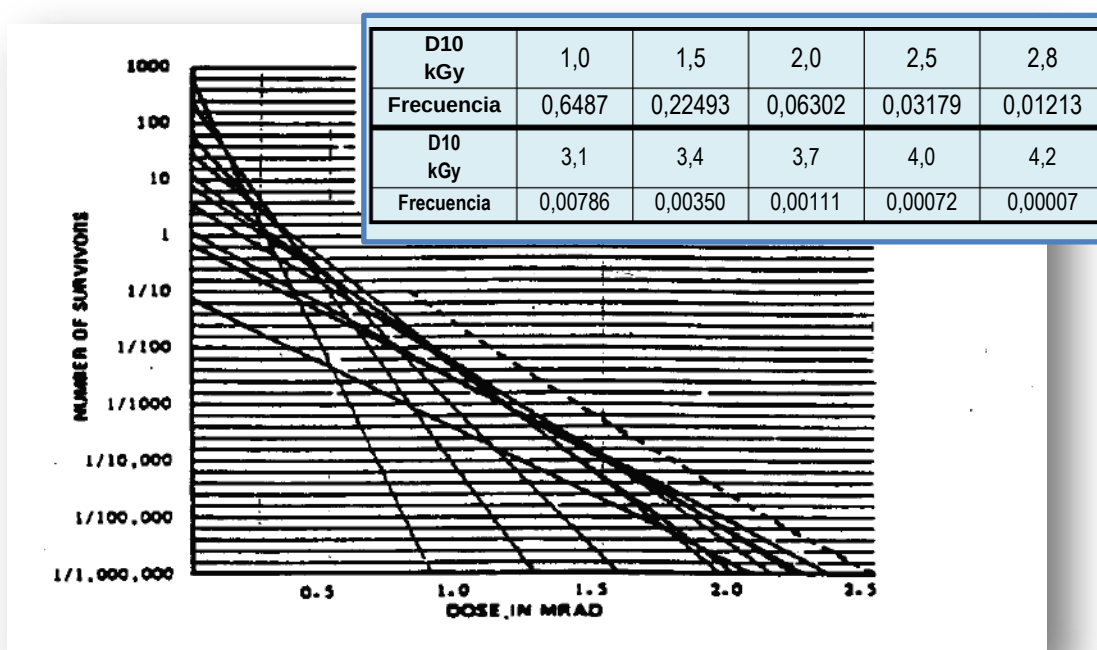


Figura 6: Curvas de inactivación de microorganismos heterogéneos de Whitby & Gelda, (W/G) (1979) y la tabla de distribución de D_{10} para 1000 microorganismos. (1Mrad=10 kGv)

En el gráfico de la Figura 6, se observa una serie de curvas pertenecientes a diferentes números iniciales y tipos de organismos, cada uno con su pendiente particular, resultando una curva total no lineal llamada Distribución Estándar de Resistencias (DER). A partir de ella se puede deducir que, para una carga microbiana inicial de 1000 UFC, con 25 kGy (2,5 Mrad) se alcanza el nivel de seguridad de esterilidad de 10^{-6} (1/1.000.000). De esta manera se puede evidenciar que dicha dosis, tradicionalmente considerada como dosis mínima de esterilización, no asevera racionalmente que el producto tratado haya recibido la efectiva dosis de esterilización sino se realizan los ensayos de determinación de carga microbiana y verificación de la radiosensibilidad. Puede darse que la carga microbiana sea mayor a 1000 UFC/producto, o que la

radioresistencia de los microorganismos presentes en el producto sea mayor.

Métodos según la Norma ISO 11137:2006, parte 2:

La parte 2 de la Norma describe métodos que pueden ser utilizados para establecer la dosis de esterilización, los cuales se eligen de acuerdo a 2 enfoques:

- a) Determinación de la dosis para obtener una dosis específica para el producto: Método 1 y 2
- b) Convalidación de dosis para verificar una dosis pre-seleccionada de 25 kGy o 15 kGy: Método VD_{max}

El *método 1* se usa para determinar la menor dosis necesaria de esterilización para la carga microbiana determinada. Este método puede ser usado cuando se desea la menor dosis de esterilización posible por razones de costos de irradiación, cuando hay materiales sensibles a la radiación o cuando la carga microbiana es mayor a 1000 UFC por producto. La desventaja es que requiere un alto número de muestras.

El *método 2* usa los datos derivados de la inactivación de la población microbiana en su estado natural como se presentan en el producto. Involucra la realización de ensayos de esterilidad en las unidades de producto que han recibido dosis de esterilización crecientes sucesivas por debajo de la dosis de esterilización. Los resultados de estos ensayos son usados para predecir la dosis necesaria para alcanzar un nivel de seguridad de esterilidad predeterminado. Requiere un número de muestras muy elevado, superior al método 1, aunque es recomendable para poblaciones microbianas donde se desconoce su D_{10} por las condiciones del producto (cuando no fueron determinados previamente).

El *método VD_{max}* , es indicativo de la convalidación de una dosis de esterilización preseleccionada. Requiere un número bajo de muestras, lo cual es conveniente cuando son lotes pequeños de producción, o los mismos son muy costosos. Existen 2 alternativas estandarizadas: VD_{max}^{15} y VD_{max}^{25} . Estas alternativas tienen la limitante de la carga microbiana máxima que puede estar presente en la unidad de producto: 1,5 UFC por producto para el VD_{max}^{15} y 1000 UFC para el VD_{max}^{25} .

En el método VD_{max} se calcula la máxima dosis de verificación posible para el producto, para reducir el riesgo de falla debido al bajo número de muestras.

La determinación de dosis mínima por cualquiera de los métodos mencionados, se debe realizar sobre 3 lotes, cuando son producciones frecuentes y en este caso, mientras no se cambie ninguna etapa del proceso que pueda influir en la carga microbiana, la dosis determinada sigue siendo válida para lotes posteriores de producción. Periódicamente se deben realizar auditorías de validez de la dosis, como mantenimiento de la validación. Se realiza sobre 1 lote de producción, cuando este sea único o infrecuente. En este caso, la dosis es válida solo para dicho lote.

Los requerimientos técnicos básicos para generar la información requerida para la selección de la dosis de esterilización utilizando cualquiera de los mencionados métodos son [1]:

- a. El producto médico específico a ser sometido al proceso de esterilización debe estar fabricado bajo las Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Médicos, para asegurar una producción uniforme y controlada del mismo.
- b. Tener acceso a los servicios de un laboratorio de microbiología y materiales
- c. Los ensayos microbiológicos para la determinación de la carga microbiana del producto y los de esterilidad, como parte de estos métodos, deberán ser realizados de acuerdo a las normas ISO 11737 parte 1 y 2 respectivamente.
- d. Tener acceso a instalaciones o equipos que entreguen dosis desde <1 kGy, pudiendo ser:
 - Fuentes de radiación de ^{60}Co ó ^{137}Cs
 - Irradiadores de haces de electrones o rayos-X.

Se debe tener en cuenta que los niveles energía y tasa de dosis de estos equipos sean similares a aquellos usados en el proceso de esterilización del lote correspondiente del producto.

Consideraciones generales para los ensayos de determinación de la dosis de esterilización:

- Las muestras de producto deben ser representativas de la totalidad del lote fabricado.
- Realizar los ensayos de carga microbiana inicial y verificación de dosis con el producto terminado o como se acondicione, previo al proceso de irradiación
- Se debe tener en cuenta que la presencia de un alto número bacterias Gram negativas puede significar presencia de endotoxinas bacterianas, y éstas son altamente resistentes a las radiaciones.
- En el caso de juegos de producto que contiene múltiples dispositivos del mismo producto dentro de un único envase, se considera cada uno como unidad de producto.
- Cuando contienen múltiples productos, se considera cada producto individualmente.
- Cuando se irradian las muestras con la dosis de verificación calculada debe tener en cuenta, que se entregue con una dispersión no mayor del $\pm 10\%$ respecto de la dosis solicitada.
- Tanto en el recuento de la carga microbiana inicial como en la irradiación de las muestras para el ensayo de verificación de la dosis de esterilización puede realizarse con la unidad del producto en su envase original o con porciones normalizadas del producto, preferentemente en su envase original. En el caso de usarse una porción normalizada de producto (cuando el producto es muy grande o el lote de producción es muy pequeño) debe estar demostrada que la porción elegida de muestra es la adecuada [2]
- El acondicionamiento de las muestras, para la irradiación con la dosis de verificación, debe realizarse en acuerdo con el laboratorio de irradiación/dosimetría.
- La condición de irradiación de las muestras con la dosis de verificación debe ser la misma que la del proceso de irradiación de la totalidad del lote de producción.

1.2. Determinación de la dosis máxima compatible:

Una guía para este proceso consiste en la realización de un estudio que incluya la selección del o los materiales de envase y producto, tomando en consideración la información disponible sobre la tolerancia a la radiación de los distintos materiales.

Se irradian muestras del material seleccionado con dosis que cubran el rango de tratamiento del producto, con márgenes adecuados. Conociendo el factor de homogeneidad de dosis de la instalación donde se realizará la esterilización, se puede calcular cuál es la máxima dosis (D_{max}) que recibe parte de los productos cuando se irradian con la dosis mínima de esterilización (D_{min}). La D_{max} es la mínima dosis que se debe aplicar a las muestras de productos y envases durante la evaluación de la compatibilidad de materiales. Sin embargo, es conveniente contar con un margen de operación más amplio, para lo cual se recomienda irradiar muestras con dosis crecientes p. ej. hasta 70 kGy, de modo de establecer cuál es la dosis máxima que puede aplicarse con seguridad de no afectar la funcionalidad o estabilidad del producto.

Las propiedades a estudiar dependen del tipo de producto, de la función que debe cumplir y de la clase de material. Por lo general se requiere realizar ensayos de las propiedades mecánicas (especialmente en productos médicos, envases, insumos de laboratorio), aunque en ocasiones otras propiedades como la coloración o estabilidad de un principio activo pueden ser determinantes en cuanto a la compatibilidad con el tratamiento.

Se efectúan ensayos de las propiedades elegidas tomando como referencia las muestras no irradiadas para establecer el grado de deterioro, si lo hay, causado por cada dosis aplicada. La dosis máxima que podrá aplicarse al producto será aquella para la cual no se ha detectado deterioro en las propiedades consideradas críticas, o bien el deterioro experimentado es menor o igual al máximo aceptable para que no se afecte la funcionalidad del producto.

En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de ensayos que se pueden realizar para evaluar funcionalidad:

Tabla 2: Ensayos funcionales de acuerdo al uso final

Para fragilidad	Mecánicos (tracción, flexión, impacto, dureza, compresión, desgarro)
Para coloración:	- índice de amarilleo - espectrometría óptica - medición de color
Para biocompatibilidad:	- compatibilidad con linfocitos - reactividad intracutánea - cultivo de tejidos

2. Calificación de la Instalación

La **calificación de la instalación** tiene por objeto demostrar que el irradiador y sistemas auxiliares han sido instalados y operan de acuerdo a su especificación. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador.* El fabricante verificará que ha sido cumplimentada.

La misma incluye:

- *Documentación de la Planta* (especificaciones, características y descripción del irradiador, del sistema de transporte, procedimientos de operación, modificaciones realizadas, etc).
- *Definición de los parámetros críticos del proceso:* Para *plantas gamma* los parámetros críticos son el tiempo de exposición, tiempo por posición, velocidad del sistema de transporte, temporizadores y mediciones de dosis. En instalaciones con *aceleradores de electrones y rayos X*, los parámetros deben incluir las características del acelerador (corriente promedio, energía de los electrones, ancho de barrido), velocidad del sistema de transporte y mediciones de dosis.
- *Plan y manual de Mantenimiento Anual*, programa de pruebas periódicas para verificar el correcto funcionamiento de la los sistemas.
- *Plan de calibración* para asegurar que los equipos y sistema dosimétricos son trazables a estándares o referencias nacionales.

3. Calificación de Operación

La calificación de Operación tiene por objeto demostrar que el irradiador instalado es capaz de operar -de acuerdo con sus procedimientos operativos- y de entregar dosis apropiadas dentro del criterio de aceptación definido. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador.* El fabricante verificará que ha sido cumplimentada.

La caracterización del irradiador (en lo que respecta a la magnitud, distribución y reproducibilidad de la dosis entregada, se realiza mediante mapeo de dosis sin carga de producto (irradiación *en aire*) y/o con producto simulado con elementos de características similares a productos reales a diferentes tasas de dosis en condiciones reales de irradiación. Para ello se colocan dosímetros en múltiples posiciones para determinar la distribución de dosis en el producto

Para *plantas gamma* y de *rayos X* se realizan mapeos de dosis en aire ó con producto simulado. En *aceleradores de electrones* el mapeo de dosis es realizado con producto simulado -material de densidad homogéneo- no sólo caracteriza la distribución de dosis sobre el volumen utilizado para la irradiación del producto transportado a través del campo de radiación, sino que establece la relación entre la dosis y su distribución respecto a los parámetros de operación del acelerador sobre los límites operacionales encontrados en la irradiación de productos.

4. Calificación de Performance

La **calificación de performance** utiliza producto real para demostrar que el irradiador opera de acuerdo a criterios predeterminados y que el resultado del proceso satisface los requisitos especificados. Para realizar este paso es necesario conocer previamente las características del producto y rango de dosis especificados por el cliente (de acuerdo a los resultados de la Calificación del Producto).

La calificación de performance implica la determinación del patrón de carga y mapeo de dosis del producto en su embalaje. *Esta etapa es responsabilidad del irradiador en conjunto con el fabricante.*

4.1 Determinación del Patrón de Carga

Se debe establecer el patrón de carga para cada tipo de producto. La especificación del mismo debe documentar:

En *plantas gamma y de rayos X*

- Descripción del producto en su embalaje y su orientación dentro del mismo, incluyendo dimensiones, peso y densidad, y variaciones aceptables de ésta última
- Descripción de la disposición de los bultos en el dispositivo de irradiación
- Descripción del dispositivo de irradiación y sus dimensiones

En *aceleradores de electrones*:

- Descripción del producto en su embalaje y su orientación dentro del mismo, incluyendo dimensiones, peso y densidad, y variaciones aceptables de ésta última
- Orientación del producto respecto a la dirección del movimiento del sistema de transporte y el haz de electrones
- Descripción de la disposición de los bultos en el dispositivo de irradiación
- Descripción del dispositivo de irradiación y sus dimensiones

4.2. Mapeo de Dosis en el Producto

El mismo permite conocer la distribución de la dosis -para un tiempo determinado- en todo el volumen del producto para el patrón de carga establecido y asegurar la reproducibilidad del proceso. La información obtenida se utilizará posteriormente para determinar las posiciones de monitoreo de dosis en el proceso de rutina.

Para realizar un mapeo de dosis, se distribuyen dosímetros en puntos estratégicos del volumen, los cuales se eligen de acuerdo a antecedentes y en base a la posición relativa producto-fuente. Se realiza para un número de dispositivos de irradiación -representativo de la condición real de irradiación- suficiente para determinar la variación de la dosis absorbida entre los mismos.

Una vez finalizado el mapeo de dosis se evalúa si la uniformidad de dosis resultante es compatible con las especificaciones del proceso, o sea que si para la dosis mínima solicitada por el cliente, la dosis máxima alcanzada es menor que la máxima admisible. En caso de no serlo se modifica el patrón de carga tomando como referencia los resultados del mapeo inicial y se verifica dicho patrón mediante un nuevo mapeo. Asimismo se deben realizar verificaciones posteriores en puntos estratégicos para garantizar la repetitibilidad de los resultados obtenidos. **Si los resultados son aceptados, se tomarán como referencia en las irradiaciones de rutina.**

Del mapeo de dosis se obtiene la siguiente información:

- Identificación de la posición de los puntos de dosis mínima y máxima
- Relación de dosis entre posiciones de monitoreo de dosis de rutina y las de mínima y máxima
- La velocidad de dosis en distintos puntos
- La uniformidad de dosis ($D_{\max}/D_{\min}$)

Se debe realizar un mapeo de dosis cuando:

- se altera el patrón de carga de un producto

- se procesan productos nuevos (diferentes características y/o densidad, empaques no convencionales)
- recalificaciones de proceso

5. Verificación y Aprobación de los Elementos Anteriores

Se realiza una revisión de toda la información obtenida en la calificación de la instalación y de proceso, para evaluar la factibilidad de satisfacer –en forma reproducible y dentro de las especificaciones- los requisitos establecidos, para proceder entonces a la aceptación del proceso de irradiación para determinado producto o categoría.

6. Mantenimiento de la Validación realizada

- Recalibración periódica de equipos, instrumentos y sistema dosimétrico
- Recalificación de la instalación toda vez que se producen cambios que puedan afectar la distribución de dosis (después de recarga o cambio en la configuración de la fuente, modificaciones de la geometría fuente-producto)
- Recalificación del proceso (modificación del patrón de carga en el dispositivo irradiación, cambio en densidad y/o orientación del producto, cuando se observa un cambio en la tendencia de los resultados en la dosimetría de rutina, etc)
- Auditoría de la dosis de esterilización: La auditoría o control de la dosis se realiza periódicamente para confirmar la dosis de esterilización establecida para un producto médico específico. Para producciones regulares, se realiza una auditoría a intervalos de cada 3 meses con el objeto de detectar cambios cualitativos o cuantitativos de la carga microbiana que pudieran requerir un incremento de la dosis de esterilización. Cuando se introduce cambios en el proceso de producción se debe determinar la dosis de esterilización nuevamente.

Monitoreo y control de rutina

Una vez aprobados y verificados los elementos de la validación por parte de la instalación esterilizadora como por el fabricante del producto a ser esterilizado, se puede proceder a las irradiaciones de rutina.

A estos efectos, mientras no se cambie ninguna etapa del proceso e instalaciones que pueda influir en la calidad del producto, se aplicará la dosis mínima de esterilización determinada, evitando superar la dosis máxima tolerable, y en las mismas condiciones de irradiación. Se controlará cada lote de irradiación con dosímetros en los puntos de mínima y máxima predeterminados en la validación.

Conclusiones sobre el método

Las principales características del procesamiento por radiación son:

- Los productos pueden ser tratados en su embalaje final evitando riesgo de recontaminación posterior
- No hay aumento significativo de la temperatura de los productos, por lo que incluso pueden irradiarse productos congelados.
- La principal variable del proceso a controlar es la dosis
- No requiere tratamiento post-esterilización: una vez tratado el producto puede utilizarse inmediatamente, ya que no deja residuos.
- Su costo es competitivo respecto a métodos alternativos
- Es aplicable a productos a granel, ya que la energía es altamente penetrante
- Es una tecnología que no contamina el medioambiente
- Las instalaciones tienen alto nivel de seguridad y personal capacitado

Bibliografía

1. Resolución 255/94 del Ministerio de Salud.
2. ISO 11737 – 1:2006, Sterilization of medical devices – Microbiological methods – Part 1: Estimation of population of microorganisms on product.
3. ISO 11737 – 2:2009, Sterilization of medical devices – Microbiological methods – Part 2: Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process.
4. ISO 11137-1:2006, Sterilization of health care products – Radiation – *Part 1 Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.*
5. ISO 11137-2:2006, Sterilization of health care products – Radiation – Part 2: *Establishing the sterilization dose*
6. ISO 11137-3:2006, Sterilization of health care products – Radiation – Part 3: *Guidance on dosimetric aspects.*
7. ISO 11607:97 envases para dispositivos médicos esterilizados en su envase final
8. AAMI/TIR 17 Lineamientos para la calificación de materiales de productos a ser esterilizados por radiación.

Esterilización por Óxido de etileno

Nora Carbone

- *Fundamentos y características del método*
- *Esterilizadores*
- *Proceso*
- *Validación y control de ciclos de rutina*
- *Liberación de la carga*
- *Aplicación en productos médicos, incompatibilidades y limitaciones del método*
- *Controversias y conclusiones sobre el método*
- *Bibliografía*

Fundamentos y características del método

La esterilización por óxido de etileno (EO) es una metodología química a baja temperatura basada en la utilización de un gas altamente eficaz como agente esterilizante, permeable y difusible a través de empaques y productos.^{(1), (2)}

A partir del advenimiento de los productos médicos descartables comienza su uso masivo en la esterilización industrial como alternativa a la radiación, siendo el segundo método de esterilización en hospitales para el procesamiento de ítems sensibles al calor.⁽¹⁾

El hecho que el óxido de etileno sea un excelente esterilizante gaseoso se debe en gran parte a sus características fisicoquímicas, que se resumen en la Tabla 1.

El EO se disuelve en la matriz de polímeros naturales y sintéticos ^{(3),(4)} poseyendo además una muy buena compatibilidad con la mayoría de los materiales constitutivos de los productos médicos⁽¹⁾. Su elevada penetración en polímeros trae como consecuencia negativa la necesidad de eliminar residuales del gas de los productos una vez finalizado el ciclo de esterilización.⁽¹⁾

Otro inconveniente para su aplicación radica en las medidas de seguridad operativa a implementar, dado que es inflamable y explosivo en proporción del 3,6-100 % volumen en volumen en aire. ^{(2), (3)}

Su actividad microbicida radica en la capacidad del anillo inestable y reactivo de la molécula de EO de producir reacciones químicas de alquilación, fundamentalmente sobre ácidos nucleicos DNA y RNA, y sobre proteínas estructurales y enzimas ^{(1),(2),(3),(4)}

La eficacia de la reacción química es influenciada por la concentración del óxido de etileno y por la temperatura, así como por el contenido de humedad de los microorganismos; de la interrelación entre estas tres variables deriva el tiempo de contacto mínimo necesario para lograr el nivel de seguridad en la esterilización.^{(2),(3)}

La humedad cumple un rol crucial en la eficacia de la reacción química de alquilación; es sinérgica con el EO para la inactivación de las esporas bacterianas y facilita la penetración del EO en el cortex de las esporas ⁽¹⁾. La humedad relativa óptima requerida para la esterilización por EO ha sido objeto de numerosos estudios, a veces

con resultados contradictorios.^{(1),(2)}

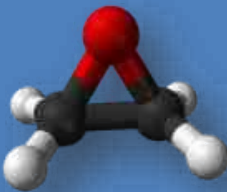
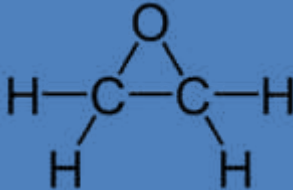
Estudios in vitro a temperatura ambiente demostraron que un tenor de humedad inferior al 20% es ineficaz, considerándose niveles ideales de humedad relativa aquellos comprendidos entre un 35 y 45%⁽⁵⁾. Otras investigaciones demostraron que actividad bactericida aumenta cuando se incrementa la humedad relativa, con un máximo de eficacia con tenores superiores al 70%⁽⁶⁾. Normalmente se preselecciona en los ciclos valores entre 50 y 70% de humedad relativa.^{(3),(4)}

Una explicación plausible a la necesidad de emplear altos tenores de humedad relativa es que en las condiciones prácticas de trabajo la difusión del vapor de agua es lenta, estableciéndose una competencia por el vapor de agua disponible y por el EO gas entre el papel, los plásticos y los microorganismos a ser hidratados⁽³⁾, condiciones muy distintas a las experiencias in vitro de Phillips y Kaye.⁽⁵⁾

Con respecto a la concentración del gas, es recomendable que la misma no supere los 600 mg/ litro de cámara; está demostrado que trabajar con concentraciones superiores a 450 mg/ litro causa muy poco efecto en el incremento de la capacidad biocida del proceso⁽⁴⁾.

En referencia a la temperatura, el gas esteriliza desde los 30°C-35°C; por encima de los 45°C un aumento en la concentración del gas representa poco incremento en la velocidad de la reacción. Las temperaturas óptimas de trabajo oscilan de los 45 °C a 55 °C⁽²⁾. En el rango de 30° a 60°C, la velocidad de muerte disminuye a la mitad por cada 10°C que disminuye la temperatura. (Q_{10} de 2 a 3)⁽³⁾

Tabla 1: Propiedades físicas del óxido de etileno

 	
Propiedades físicas	EO (óxido de etileno) = C ₂ H ₄ O
Punto de fusión	- 112 °C
Punto de ebullición	10,4 °C
Peso molecular	44 g/ mol
Presión de vapor	600 mmHg
Densidad relativa al agua (agua=1)	0,9
Densidad relativa al aire (aire=1)	1,5
Temperatura autoignición	429 °C
Explosividad (% en aire)	3- 100 %
Solubilidad en agua	Muy elevada

Esterilizadores

El EO, sustancia gaseosa en condiciones normales de presión y temperatura, se utiliza licuado a presión en cápsulas o tanques multidosis; los últimos deben ser lavables y almacenarse en sitios ventilados, al abrigo de la luz.^{(4), (7)}

El gas puede utilizarse puro o en mezclas con gases diluyentes, principalmente dióxido de carbono o freones ecológicos, gases que proporcionan un medio diluyente inerte al óxido de etileno.

Actualmente la mayor parte del equipamiento disponible se diseña para trabajar con óxido de etileno puro, para evitar la contaminación del medio ambiente por los disolventes halogenados. Por otra parte, la utilización de CO₂ como diluyente no ha resultado históricamente muy útil por las deficientes propiedades dinámicas de la mezcla; se evidencia variación en la composición del tanque multidosis a medida que el mismo se vacía ⁽⁴⁾

Además del esterilizador propiamente dicho, se utiliza equipamiento auxiliar constituido por cámaras de preacondicionamiento y cámaras de aireación forzada de los productos esterilizados. ⁽⁷⁾

Cámaras de preacondicionamiento:

Las cámaras o habitaciones de preacondicionamiento son recintos con humedad relativa y temperatura controlada. La humedad predeterminada para el proceso se logra por inyección de vapor de agua ⁽⁷⁾; la temperatura preseleccionada se logra por inyección forzada de aire precalentado por intercambiadores de calor o por resistencias eléctricas.

El aire inyectado en el recinto o cabina puede recircular hasta en un 100%. Las cámaras deben tener un sistema de registro de datos de humedad relativa porcentual y temperatura a lo largo del tiempo. ⁽⁷⁾

Los materiales de construcción de las cámaras deben ser fácilmente lavables, con diseño que permita facilidad de desinfección interna y externa debido al riesgo de acumulación de hongos. ⁽⁷⁾. Entre los materiales de construcción pueden utilizarse paneles térmicos de poliestireno o poliuretano expandido.

Equipos esterilizadores:

Los esterilizadores por EO puro funcionan realizando todo el proceso a presión subatmosférica. ⁽⁸⁾

Los esterilizadores con suministro de gas mezcla operan a presión superior a la atmosférica en la etapa de esterilizado ⁽⁸⁾. El EO se proporciona en tanques multidosis ó en cartuchos descartables de aluminio que contienen el EO para una única dosis o ciclo, conforme al volumen de la cámara y a la concentración de EO que se desea lograr ^{(2),(8)}. En este último caso los cartuchos se colocan dentro del esterilizador en un portacápsula interno, el que se perfora durante el ciclo permitiendo la difusión del gas en la cámara y productos. ^{(2), (8), (9), (10), (11)}

Otros servicios o suministros conexcionados al esterilizador comprenden:

- Fuerza motriz 220 V/ 380 V
- Vapor de agua para humectación
- Agua destilada
- Agua corriente a 15 °C para bomba vacío de anillo líquido
- Aire comprimido
- Nitrógeno criogénico (opcional)
- Equipo convertidor de efluentes conexcionado al sistema de vacío ("scrubber")

El equipamiento esterilizador debe cumplir con las normativas de construcción vigentes en guías internacionales ^{(8),(9)} y con las recomendaciones establecidas en resoluciones nacionales para equipamiento de servicios de esterilización en establecimientos de salud. ⁽¹¹⁾

Los esterilizadores deben contar con una unidad de control automática, a la que estén conectados los instrumentos de control del proceso, y con un registrador alfanumérico o gráfico de los parámetros del proceso ^{(8),(9)}. Los requisitos que deben cumplir los instrumentos de control, de registro e indicadores se especifican en detalle en las normativas vigentes para esterilizadores por EO. ^{(8), (9)}

El material que constituye la superficie interna del esterilizador debe ser resistente a la corrosión; normalmente se utiliza acero inoxidable serie 316 para partes de la cámara y estantes en contacto con la carga; y acero inoxidable de la serie 304 para componentes del equipo sin contacto con el producto. ^{(8), (9)}

En esterilizadores de pequeño volumen suele utilizarse el aluminio como material de construcción de la cámara, por su elevada capacidad de transmisión del calor.

Para los componentes del equipo previos al ingreso del óxido de etileno a cámara se puede utilizar acero al carbono, aluminio, hierro galvanizado o bronce. Debe evitarse el uso del cobre en cualquier parte del equipamiento que tome contacto con el óxido de etileno, por la capacidad de este metal de catalizar la polimerización del gas esterilizante.^{(8),(9)}

Los esterilizadores deben contar con un vaporizador para precalentar el gas antes de su admisión a la cámara del esterilizador ^{(7),(9)}.

Debe realizarse obligadamente tratamiento de efluentes del esterilizador ^{(9),(11)}, existiendo las siguientes alternativas:

- Hidrólisis ácida en tanque convertidor
- Combustión: por acción de la llama, sólo aplicable a EO puro
- Conversión catalítica: sólo aplicable a EO puro, convierte EO en CO₂ y agua
- Recuperación del EO para otros fines industriales
- Eliminación a los 4 vientos

Cámaras de aireación forzada:

Las cámaras de aireación forzada de los productos son recintos con control de temperatura en los que 100 % de aire exterior prefiltrado es obligado o forzado a circular a través de los productos, para ser finalmente eliminado por venteo al exterior a 7 metros por encima del nivel de edificación, sin recirculación del aire^{(7),(11)}. La temperatura predeterminada para el proceso se logra precalentando el aire por intercambiadores de calor o por medio de resistencias eléctricas.

Los materiales de construcción deben ser fácilmente lavables, con diseño sin recovecos y sistema de cierre hermético.

Las cámaras deben tener un sistema de registro de datos de temperatura y tiempo. ⁽⁷⁾

Área de instalación del equipo:

El área donde se encuentra instalado el esterilizador debe encontrarse en depresión respecto de áreas adyacentes, con renovación de aire mínima de 10 renovaciones por hora.⁽¹⁰⁾

En las instituciones de salud es mandatoria su instalación en recintos separados de otros equipos, lejos del tránsito del personal.^{(8),(10),(11)}

Para esterilizadores con volúmenes de cámara útil superiores a 290 litros, son aplicables requisitos de instalación eléctrica antiexplosiva establecidos en normas de referencia americanas ó europeas.⁽¹²⁾

Debe contarse con sistemas de captación local del gas, principalmente sobre la puerta del esterilizador. El área de trabajo con el esterilizador operando debe asegurar una concentración ambiental promedio que no supere el límite ambiental permitido. Es conveniente, y mandatorio para esterilizadores de gran volumen, instalar monitores fijos seteados a un nivel de alarma correspondiente a un 25 % del límite inferior de inflamabilidad del óxido de etileno, correspondiente a 7,5 ppm ⁽¹²⁾

Proceso

Cargas y empaques:

En el desarrollo del proceso se incluye la especificación de las cargas a procesar, las que podrán ser homogéneas o mixtas. En éste último caso debe elegirse para seleccionar los parámetros del proceso y validarlo la peor condición de carga mixta en materiales y densidad ("carga de referencia") ⁽⁷⁾.

Se debe establecer la configuración de las cargas y la selección de empaques primarios y secundarios.

La confección y la naturaleza constitutiva del empaque primario y secundario debe tener en cuenta la facilidad de

remoción del aire y la penetración o difusión del vapor de agua y del gas esterilizante.^{(1),(4)}

La permeabilidad al EO del empaque debe ser tal que facilite una desorción rápida del producto que lo ha adsorbido.⁽³⁾

Los empaques utilizados en el campo hospitalario y en la industria son: ^{(2),(4),(10),(15)}

- Papel blanco plano o crepado para uso médico.
- Telas no tejidas, 100% sintéticas polipropileno no tejido tricapa (SMS), o con combinación de celulosa y fibras sintéticas.
- Bobinas termosellables con papel plano o de Tyvek[®] (poliolefinas entrecruzadas) y laminado polietileno – poliéster ó polipropileno - poliéster.
- Blister rígidos PVC, PET, poliamida-polietileno y papel blanco plano o Tyvek.[®]
- Film de polietileno de baja densidad ≤ 80 u de espesor.
- Bandejas termoformadas ABS, PVC, PET ó HDPE.
- Polietileno film de 40 a 100 micrones de espesor.

Etapas del proceso

Preacondicionamiento:

En esta etapa la carga es sometida a condiciones predeterminadas de temperatura y humedad relativa durante el tiempo mínimo necesario para lograr dentro del producto los rangos de valores de temperatura y humedad especificados para estas variables. Se utiliza para humidificar la carga una humedad relativa igual o superior al 30%.⁽⁷⁾

La humidificación se logra por inyección de vapor, y la temperatura por inyección forzada de aire al recinto.⁽⁷⁾

Es necesario establecer el tiempo máximo que debe mediar entre el retiro de la carga de preacondicionamiento y el inicio del ciclo de esterilización, a fin de evitar la pérdida de las condiciones logradas en esta etapa ⁽⁷⁾. La etapa de preacondicionamiento puede omitirse, realizando directamente el acondicionamiento en la misma cámara del esterilizador, aunque en estos casos la duración del ciclo de esterilización se prolonga en forma poco operativa.⁽⁷⁾

Ciclo de esterilización:

Finalizado el preacondicionamiento, la carga se traslada al esterilizador y comienza el ciclo.

Se recomienda no exceder un 75 % del volumen útil disponible de la cámara. ^{(2), (3), (10)}

Básicamente las etapas de un ciclo tipo que opera con EO puro son:

a) Inicio de ciclo y Pre calentamiento

El sistema de calefacción del esterilizador permite lograr la penetración y homogeneización de la temperatura en la cámara y en los paquetes al valor establecido para el proceso.

Esta etapa es uno de los puntos críticos del proceso, ya que si la carga no ha sido sometida a preacondicionamiento previo a su ingreso al esterilizador, puede demandar horas lograr que partes internas de los paquetes alcancen el valor de temperatura estipulada.

b) Remoción del aire

El sistema de vacío del equipo entra en funcionamiento hasta lograr el valor preestablecido de vacío en cámara.

Generalmente se utilizan bombas de anillo líquido, o sistema Venturi. Cuanto mayor es el nivel de vacío logrado, se facilita la difusión del vapor de agua y posteriormente del gas a través de la carga; ⁽¹⁾ por otra parte, la reducción del tenor de oxígeno permite que la proporción de EO en la cámara se encuentre por

debajo del límite de explosividad. ⁽¹⁾

El nivel de vacío y la velocidad para lograrlo están limitados por la naturaleza de los empaques; debe evitarse desgarro o explosión de los sellos de los paquetes, principalmente si se utiliza polietileno en film. ^{(1), (2), (4)}

Una alternativa a efectuar niveles de vacío demasiado profundos consiste en proceder a la inyección de un gas inerte, como el nitrógeno, luego una remoción moderada del aire. ⁽⁷⁾

c) *Acondicionamiento*

El producto que ha sido preacondicionado inicialmente puede perder humedad durante la etapa de vacío inicial del ciclo; por lo tanto se somete nuevamente al producto a inyección de vapor a la temperatura preseleccionada. ⁽⁷⁾

Una inadecuada humidificación durante el proceso se considera la mayor causa de falla microbiológica. ^{(1) (2)}

Se puede humectar por inyección de vapor hasta lograr el incremento de presión (ΔP) para lograr el tenor de humedad estipulado para esa temperatura, seguido de una etapa corta de estabilización, ó más eficientemente por medio de sucesivas inyecciones y evacuaciones de vapor hasta lograr el tenor de humedad especificado ^{(1), (2)}

En la etapa de acondicionamiento se monitorea y registra temperatura y tiempo; el valor de humedad relativa % se lee y registra en forma directa sólo en algunos esterilizadores con sensores de humedad incorporados; de lo contrario el cálculo de la humedad relativa se realiza en forma indirecta por fórmula, a partir del dato de incremento de presión en cámara debida a la inyección de vapor de agua. ^{(2), (7), (9)}

$$\% RH = 100 \times P_v / P_g$$

donde:

P_v = presión parcial en la mezcla de gases debida al vapor de agua

P_g = presión de saturación del vapor de agua a la temperatura de esterilizado

d) *Inyección del gas*

Se procede a admitir el ingreso del gas esterilizante a la cámara.

Las normas vigentes exigen que el gas ingrese precalentado y filtrado a fin de evitar el ingreso de óxido de etileno líquido y polímeros sólidos a la cámara del esterilizador. ^{(2), (7), (8), (9)}

e) *Exposición al gas o etapa de esterilizado propiamente dicha.*

En esta etapa el producto es expuesto al gas con las condiciones de temperatura y humedad relativa deseadas, durante el tiempo mínimo establecido para el proceso.

La homogenización en la distribución del gas se puede lograr por ventiladores eléctricos; los mismos son motores sellados antiexplosivos para no generar chispa eléctrica, realizando así una convección forzada del gas. ⁽⁷⁾

En muchos casos y en cámaras pequeñas sólo se opera por convección natural, generalmente por circulación forzada de agua caliente en la entrecámara ó por calentamiento eléctrico por resistencias.

En el esterilizado los parámetros registrados y monitoreados son temperatura, tiempo y presión en cámara. ⁽⁷⁾

La concentración de EO en cámara se calcula indirectamente por el consumo del EO cuando el esterilizador está abastecido por tanques, leyendo la disminución de peso del mismo (control por peso), y por medio de fórmulas utilizando la lectura del ΔP en cámara que acompaña la inyección de gas. ⁽⁷⁾

En equipos con tecnología más sofisticada la concentración de EO en cámara en puede también medirse en forma directa por medio de cromatografía gaseosa ^{(2), (7)}

f) *Remoción del gas esterilizante de la cámara - etapa comúnmente llamada "ventilación" o "desgasificación".*

Finalizado el tiempo de esterilizado, se elimina el gas de la cámara y de los productos, siendo el procedimiento más común la realización de evacuaciones repetidas del gas, alternadas con inyección de nitrógeno y aire filtrado, o sólo con aire filtrado.

Se recomienda repetir el procedimiento 20 veces como mínimo, para eliminar la mayor proporción posible de gas EO de la cámara y de los paquetes. ⁽²⁾

La bomba de vacío se conecta a un tanque convertidor ("scrubber") para el vertido del EO en agua acidulada y lograr su conversión completa a etilenglicol, producto menos tóxico y biodegradable. ^{(2),(11)}

Otra mecánica consiste en realizar un sistema de barrido con la cámara en ligera depresión, efectuándose una salida al exterior a los cuatro vientos desde el sistema de vacío a 7 metros por encima del nivel de edificación^{(2),(11)}

g) *Fin de ciclo.*

Se realiza la inyección de aire precalentado y prefiltrado por filtros de alta eficiencia ^{(8),(9)} hasta romper el vacío de la cámara. Por último se procede a retirar los productos del esterilizador y transferir la carga a las cámaras de aireación forzada.

h) *Aireación forzada.*

Finalizado el ciclo de esterilización se traslada la carga al aireador, donde la misma se somete a circulación forzada de aire a temperatura controlada para eliminar los residuos tóxicos de EO y derivados presentes en el producto.

De no disponer de recintos para la aireación forzada del material, la etapa f) del ciclo de esterilización debe prolongarse hasta que el nivel de residuales en los productos se encuentre por debajo de los límites establecidos.

i) *Cuarentena.*

El producto permanece en depósito de cuarentena, hasta la realización de los controles finales, que incluyen la lectura de los cultivos de los bioindicadores.

Validación del proceso

Validar es obtener y documentar evidencias que prueben en forma fehaciente que un equipo y/o proceso cumple en forma repetitiva con criterios de aceptación predeterminados.

En la validación de un proceso de esterilización por EO distinguimos las siguientes etapas en forma secuencial:

- Aptitud del equipo:
 - Calificación de la Instalación (I.Q.)
 - Calificación Operativa (O.Q.)
- Calificación de Desempeño (P.Q.):
 - Microbiológica
 - Física
- Confección del Informe Final de Validación

Aptitud del equipo:

- Calificación de la Instalación (I.Q.)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos de la instalación del equipo y los suministros de planta son los correctos. Se deben cumplir las especificaciones del fabricante.

Estos aspectos son:

- Características del equipo y sus componentes: Se verifica visualmente para los componentes la correspondencia de: tipo, modelo, nro. de serie, fabricante, en listado tipo "check list".
- Software: El software instalado en el equipo al igual que sus funciones y parámetros iniciales debe ser el especificado por el fabricante y debe validarse.

- Verificación de los suministros: Para cada uno de los suministros debe verificarse: tensión, capacidad instalada, presión de línea, caudal, calidad, válvula, conexión disponible, etc.
- Planos y Manuales de servicio y de operación: Los planos de instalación, de cañerías y de circuitos eléctricos deben estar actualizados, disponer de título, código, revisión y fecha de validez. Los planos deben ser contrastados con el equipo y los servicios. Se debe verificar la existencia de manuales de servicio técnico y de operación, y desarrollar procedimientos escritos para la operación y el mantenimiento del equipo.
- Calibración de instrumentos: Deben estar calibrados frente a instrumentos patrón todos los instrumentos de control, de registro, de referencia visual y de seguridad operativa del esterilizador y de todo el equipamiento accesorio.

- Calificación operativa (O.Q.)

Es la verificación documentada de que el equipo funciona dentro de los límites o rangos predeterminados cuando se lo opera sin carga, bajo instrucciones de uso.

Para efectuar los ensayos físicos de calificación operativa del esterilizador y para la posterior calificación física de las cargas, se emplea instrumental de validación.

Éste consiste en termocuplas y sensores de presión conectados a adquirentes electrónicos de datos (“validadores”) y/o equipos portátiles tipo data logger de temperatura, humedad relativa y/o presión.

Todos los instrumentos de validación deben estar calibrados y ser de mayor exactitud que los instrumentos propios del esterilizador.

La cantidad de ensayos y repeticiones y la cantidad de sensores en cada tipo de ensayo a realizar en la calificación operativa se detallan en la normativa de referencia. ⁽⁷⁾

En preacondicionamiento se realizan ensayos de distribución de temperatura y humedad relativa en la cámara, y medición de las renovaciones horarias de aire. ⁽⁷⁾

En el esterilizador se realiza una prueba de hermeticidad ^{(7),(8),(9)}, y ensayos repetitivos de distribución de temperatura.

En éstos últimos ensayos el criterio de aceptación es obtener una temperatura en esterilizado en todos los puntos $\leq a \pm 3^{\circ}\text{C}$ del set point. ⁽⁷⁾

Además se deberán caracterizar y definir en el OQ: ⁽⁷⁾

- la profundidad del vacío inicial y el tiempo para lograrlo
- el incremento de la presión por entrada de nitrógeno
- el número de repeticiones o pulsos inertización
- el incremento de la presión por ingreso del vapor para humectación ΔP y cálculo de RH%)
- el incremento de la presión por ingreso del gas y gasto de gas en kg (ΔP , ΔPeso y cálculo de concentración de EO)
- la profundidad del vacío y tiempo para lograrlo en desgasificación
- el incremento de la presión por entrada de aire filtrado o nitrógeno
- el número de repeticiones o pulsos inertización y vacío - aireación

En las cámaras de aireación forzada se determina el perfil de temperaturas, caudales de aire y patrones de flujo de aire. ⁽⁷⁾

Calificación de desempeño (P.Q.)

Es la verificación documentada de que el equipo, calificado previamente como apto, cuando se lo opera con

carga de producto, permite obtener en forma reproducible un producto seguro y eficaz.

En la calificación de desempeño se procede a realizar los ensayos con la cámara cargada con cada patrón de carga a validar, ó en su defecto con la carga de referencia.⁽⁷⁾

- Calificación microbiológica

Tiene por objeto determinar el tiempo de esterilizado que asegure en todos los puntos de la carga una letalidad suficiente para lograr un SAL de 10^{-6} .

Se utilizan bioindicadores en posiciones de difícil acceso al gas, previa estimación de la carga biológica habitual del producto, o “bioburden”, y corroborando que sea ésta menor en resistencia y en población al bioindicador utilizado.⁽⁷⁾

El bioindicador de referencia para EO es *Bacillus atrophaeus* ⁽¹³⁾

El bioindicador se coloca dentro de la carga bajo su presentación comercial, o inoculando suspensiones del microorganismo dentro del producto, en los casos en que la colocación de bioindicadores dentro de la carga en lugares de difícil acceso no fuera practicable. ⁽⁷⁾

Existen dos métodos principales para llevar cabo la calificación microbiológica: ⁽⁷⁾

Método A:

Determinación de la velocidad de inactivación del indicador biológico, método de la fracción negativa, desarrollado por Holcomb- Spearman Karber.

En este método un número predeterminado de indicadores biológicos localizados dentro de la carga se someten a cinco ensayos con exposición gradual creciente en el tiempo de esterilizado, manteniendo todas las demás variables del ciclo constantes. Después de cada una de las cinco exposiciones, se procede a cultivar los bioindicadores, evaluando la proporción de los mismos que no desarrolla luego de la incubación (fracción negativa)

Obtenida la fracción negativa en las cinco corridas, por utilización de fórmulas se calcula el D (coeficiente de reducción decimal) para el bioindicador en las condiciones experimentales. Conocido el D se extrapola el tiempo de exposición al gas para lograr la reducción de 12 logaritmos de población del bioindicador.

Este tiempo definirá entonces el tiempo de esterilizado para el ciclo.

Método B:

Enfoque conservador del overkill, método del medio ciclo.

Se colocan los bioindicadores dentro de la carga, en un número acorde al volumen de la carga; el mismo se indica en la norma de referencia para la validación del proceso ⁽⁷⁾. Se somete la carga al proceso realizando tres ensayos consecutivos con idéntico tiempo de exposición al gas. Debe demostrarse en todos los casos la inactivación de todos los bioindicadores.

Es mandatorio un cuarto ensayo adicional con menor tiempo de exposición al gas que demuestre la recuperación de sobrevivientes.

Cumplido el criterio de aceptación, el tiempo de esterilizado para el ciclo se define como el doble de tiempo que el utilizado en los medios ciclos.

- Calificación física

Los sensores de temperatura y humedad se colocan dentro de la carga, perforando los empaques.

La cantidad de repeticiones de cada ensayo debe ser de un mínimo de tres para demostrar reproducibilidad⁽⁷⁾. La cantidad de sensores en cada ensayo de acuerdo al volumen de la carga se detalla en

la normativa de referencia. ⁽⁷⁾

En preacondicionamiento se evalúa el perfil de temperatura y humedad dentro de la carga durante un período de tiempo mínimo hasta que la carga alcance los valores mínimos predeterminados para estas dos variables. ⁽⁷⁾

Se efectúa un ensayo adicional de medición de las mismas variables durante la transferencia de la carga al esterilizador, a fin de establecer en la validación el tiempo máximo permitido para esta transferencia. ⁽⁷⁾

En el ciclo de esterilización se realizan ensayos de penetración de temperatura y humedad en la carga en la etapa de acondicionamiento, y de penetración de temperatura en la etapa de esterilizado. ⁽⁷⁾

Es lícito efectuar ensayos de calificación física en forma simultánea con la calificación microbiológica ⁽⁷⁾. En estos casos, los tres ensayos consecutivos se realizan con los tiempos desafío de la calificación microbiológica, por lo que obligadamente se debe complementar con un ensayo adicional utilizando tiempos más largos de exposición.

Se redefinen y caracterizan los cambios de presión a lo largo del ciclo de esterilizado debidos a la remoción del aire, ingreso de vapor, ingreso de gas EO, y pulsos de ventilación, ahora con carga de producto. Se calcula y el gasto en kg de gas operando el equipo con el producto.

En la aireación forzada se evalúa el perfil de temperatura dentro de la carga durante un período de tiempo mínimo hasta estabilización de lecturas, ⁽⁷⁾ y el tiempo mínimo de residencia de la carga hasta que los productos se encuentren dentro de los valores máximos regulados para EO y su producto de reacción, etilenclorhidrina (ECH). Para obtener estos últimos datos se realizan ensayos de determinación de niveles de EO y derivados en el producto con tiempos crecientes de aireación forzada, realizando una curva de desorción a fin de extrapolar el tiempo mínimo para obtener residuales dentro de los límites permitidos. ⁽¹⁶⁾

Existen distintos criterios para establecer los límites máximos de EO en los productos médicos. En la legislación sanitaria nacional los límites se establecen en base al criterio de concentración en el producto médico (máximo permitido en ppm: 5 ppm para EO) ⁽¹⁵⁾. En las normas internacionales el criterio vigente para su regulación es el de dosis máxima liberada al paciente, de acuerdo a la clasificación previa del producto médico por su criticidad y tiempo de contacto con el paciente: contacto temporario, prolongado ó permanente. ⁽¹⁶⁾

Cabe destacar que el etilenglicol ya no se contempla en las normas internacionales como residuo valorable por la baja probabilidad que se encuentren tenores biológicamente significativos en los productos, si el EO se encuentra dentro de los límites máximos permitidos. ^{(1), (16)}

Se resumen en la Tabla 2 los límites vigentes en la norma ISO 10993, parte 7:1998, para ambos productos de reacción. ⁽¹⁶⁾

Tabla 2: Límites para EO y ECH en productos médicos, según Norma ISO 10993-7 (2008)

TIEMPO DE EXPOSICIÓN	GAS	PROMEDIO DIARIO	PRIMERAS 24 HORAS	30 DÍAS	TODA LA VIDA
EXPOSICIÓN LIMITADA	EO	4 mg	N/A	N/A	N/A
≤ 24 hs	ECH	9 mg	N/A	N/A	N/A
EXPOSICIÓN PROLONGADA	EO	2 mg	4 mg	60 mg	N/A
> 24 hs y ≤ 30 días	ECH	2 mg	9 mg	60 mg	N/A
EXPOSICIÓN PERMANENTE	EO	0.1 mg	4 mg	60 mg	2.5 g
≥ 30 días	ECH	0,4 mg	9 mg	60 mg	10 g

Informe final de validación:

El informe debe reunir o recopilar toda la documentación obtenida en la validación, en forma ordenada y secuencial ⁽⁷⁾. El mismo debe incluir:

- Especificaciones del equipamiento.
- Registros de calibración de instrumentos.
- Registros físicos de todos los ensayos del OQ.
- Detalle de los productos, envases, diagrama de cargas.
- Resultados de las pruebas biológicas del PQ.
- Registros físicos de todos los ensayos del PQ.
- Estudios de residuales en los productos.
- Hoja de especificaciones para el proceso, con el valor y rango permitido para cada variable física del proceso.
- Registros de firmas responsables.

Revalidación:

Se debe revalidar cada vez que haya cambios en el equipamiento, proceso ó producto; cambios en los requerimientos regulatorios; ó debido al vencimiento del tiempo transcurrido desde la última validación.

Es recomendable comparar los registros de la revalidación con los de la validación original, manteniendo el mismo formato. ⁽⁷⁾

Monitoreo y control de ciclos de rutina

Monitoreo de parámetros físicos: Los parámetros físicos a monitorear y registrar para cada proceso y cada lote de producto esterilizado son: ⁽⁷⁾

En la etapa de Preacondicionamiento: tiempo de residencia de la carga, temperatura y humedad relativa porcentual, medidos en la cámara

Durante el Ciclo de Esterilización:

- tiempo y temperatura en el acondicionamiento
- nivel de vacío inicial y tiempo para lograrlo
- Δ presión y número de pulsos inertización con nitrógeno
- Δ presión por entrada de vapor en acondicionamiento (cálculo de RH%) ^{(2),(7),(8)}
- Δ presión por entrada de gas (cálculo de cc de EO) ^{(2),(7),(8)}
- Δ peso del cilindro contenedor (cálculo de cc de EO) ^{(2),(7),(8)}
- tiempo y temperatura de esterilización medida en cámara
- Δ presión en los pulsos de vacío – ingreso de gas inerte y/o aire y nro. de pulsos.

Durante la Aireación forzada

- tiempo de residencia de la carga y temperatura medida en cámara

Todos los parámetros controlados deben encontrarse dentro de las especificaciones de valor prefijado y rango permitido estipuladas en la validación del proceso.

Monitoreo químico:

Se utiliza un control químico externo (clase I Norma ISO 11.140), bajo la forma de cintas o etiquetas autoadhesivas ⁽¹⁴⁾ en cada empaque primario en la esterilización hospitalaria; y al menos un indicador externo en cada empaque secundario en la esterilización industrial de productos médicos.

La utilización de controles multiparámetro e integradores (clases IV y V de la citada norma) ⁽¹⁴⁾ se reserva para control y registro del productor, por su localización interna en el paquete.

Se debe verificar un cambio neto al punto final especificado por el fabricante finalizado el ciclo de esterilización, en todos los indicadores químicos.⁽⁷⁾

Monitoreo biológico:

Para el monitoreo de los procesos de esterilización por óxido de etileno se emplean de rutina esporas de *Bacillus atrophaeus* ⁽¹³⁾

Los bioindicadores para el monitoreo de rutina se colocan en productos simulados entre la carga, en posiciones comprometidas para la difusión del gas, antes de que el producto ingrese a la etapa de preacondicionamiento ⁽⁷⁾. El monitoreo biológico es obligatorio en todos los ciclos. ^{(7), (10), (15)}

Finalizado el ciclo de esterilización los bioindicadores se retiran de la carga y se cultivan, interpretándose los resultados como obtención de desarrollo (resultado positivo) o ausencia de desarrollo (resultado negativo). ⁽⁷⁾

Liberación de la carga

Liberación Convencional ⁽⁷⁾

- Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos
- Inactivación de todos los IB
- Cambio al punto final de los indicadores químicos

Liberación paramétrica ⁽⁷⁾ (sólo para configuraciones de carga homogéneas)

Cumplimiento de todas las especificaciones de los parámetros físicos, y adicionalmente a los requisitos para liberación convencional se debe incluir:

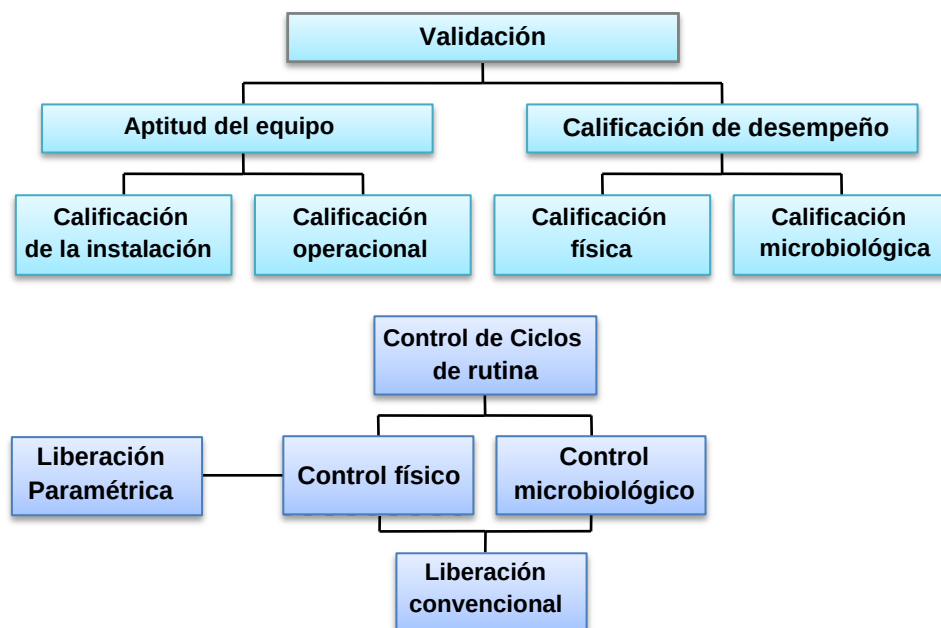
- temperatura de la carga en preacondicionamiento y en esterilizado
- humedad en la cámara en acondicionamiento medida en forma directa
- concentración de gas en cámara medida en forma directa
- temperatura de la cámara medida en dos posiciones diferentes
- temperatura de la carga y medición de renovaciones horarias en aireación

Para efectuar una liberación paramétrica, la cantidad de ensayos, metodología y criterios de aceptación efectuados en la validación física de las cargas deben cumplir requisitos adicionales a los establecidos antes en "Validación del proceso". ⁽⁷⁾

Síntesis de Validación y Monitoreo de ciclos

Los pasos de la Validación de un proceso de esterilización por EO y su correspondiente monitorización de ciclos de rutina se reseñan en el Gráfico 1.

Gráfico 1: Validación del proceso y control de ciclos de rutina



Aplicación en productos médicos, incompatibilidades y limitaciones del método

Algunas de las aplicaciones del EO en la esterilización de productos para el cuidado de la salud incluyen: máquinas de riñón artificial, catéteres cardíacos, generadores de marcapaso y cardiodesfibriladores, máquinas corazón-pulmón, filtros de diálisis, laseroscopios, placas de petri descartables, hojas de dermatomos y escalpelos, suturas absorbibles y no absorbibles, DIU, espéculos ginecológicos, jeringas y agujas hipodérmicas, tubos de traqueostomía, tubos endotraqueales, ureteroscopios, bandejas para traqueostomía, bolsas de orina y packs de ropa quirúrgica descartable ⁽¹⁾

Cabe destacar que el EO es el agente esterilizante indicado para la esterilización de dispositivos electrónicos, y productos en base a acetatos y Teflon^R ⁽¹⁾. También se utiliza en la esterilización de prótesis endovasculares con cubierta de drogas que la radiación podría dañar ⁽¹⁾.

En referencia a los materiales constitutivos compatibles con el método podemos mencionar: ⁽¹⁾

- Acetales (Delrins^R)
- Elastómeros termoplásticos o estirenos
- Teflones
- Siliconas
- Gomas naturales
- Poliámidas (Nylons alifáticos y aromáticos, 12, 11, 6/12 y 6/12)
- Poliétileno de baja, mediana y alta densidad
- Poliésteres
- Policarbonato
- Polisulfona
- Cloruro de polivinilo
- Poliuretano
- Polipropileno y sus copolímeros
- Poliestireno y sus copolímeros
- Acrílicos

Otros usos:

- El EO es utilizado además en la descontaminación de especias, cacao y frutos desecados, y como fumigante de libros, cuero, papel y muebles ^{(1) (3), (17)}
- En la industria farmacéutica se lo utiliza para esterilizar materias primas en polvo cuya irradiación altera las

estructuras activas, tales como estreptomicina, gentamicina y corticoides.^{(3), (4)}

Limitaciones técnicas del método:

- Se detecta un alto tenor de residuales de EO luego de la esterilización de PVC y gomas naturales ^{(4), (10)}, y tenores relativamente altos en polipropileno y papel ⁽⁴⁾, requiriéndose en estos casos períodos de aireación forzada o cuarentena posterior a ésta, prolongados.
- Se deben respetar los tiempos de aireación forzada o cuarentena antes de proceder a la liberación del material ⁽¹⁾, en base a la evaluación de residuales obtenidos durante la validación del proceso⁽¹⁶⁾.
- Sólo los ítems metálicos y de vidrio pueden ser utilizados con la aireación mínima mandatoria del fabricante⁽²⁾.
- Se ha documentado cracking de algunos plásticos con la utilización de óxido de etileno en mezclas con freones (policarbonato, acrílicos) ⁽¹⁾
- El proceso completo insume tiempo; pese a ser muy eficaz, no es eficiente, máxime para su empleo en instituciones de salud que requieren rápida rotación de sus bienes.

Controversias y conclusiones sobre el método

Las principales desventajas del EO como método de esterilización derivan de algunas características inherentes a la sustancia: su inflamabilidad y explosividad, su carcinogenicidad y potenciales daños reproductivos al personal expuesto ^{(1) (2) (15) (18)}, así como el alto costo del equipamiento y de los sistemas de control.

El óxido de etileno fue reclasificado por la IARC en 1994 de potencial cancerígeno a declarado cancerígeno en humanos.⁽¹⁸⁾

La mayoría de las desventajas derivadas de su utilización quedan solventadas por los sistemas de control en el equipamiento utilizado, los sistemas de eliminación de efluentes, el entrenamiento y uso de elementos de seguridad operativa para el personal, las instalaciones antiexplosivas para equipos industriales,⁽¹²⁾ el monitoreo ambiental de los niveles de EO en el área de trabajo, y los pertinentes controles de salud sobre el personal expuesto.⁽¹⁾

En la esterilización industrial a gran escala su empleo como agente esterilizante proporciona mayores ventajas que los riesgos inherentes a su utilización. ⁽¹⁾

Su aplicación en centrales de esterilización debe estar limitada a la reesterilización de productos sensibles al calor y a la humedad ^{(3) (4)} y restringida a un mínimo, reduciendo a un nivel seguro la exposición del personal y de los pacientes ⁽³⁾ por medio de buenas prácticas ^{(10) (15)} y el adecuado diseño del área ^{(10) (15)}

Bibliografía:

1. Rogers, Wayne: "Sterilization of Polymer Healthcare products". Rapra Technology Limited, p.205, 2005, U.K.
2. Agostini, Helga Sager: "Nociones básicas sobre la esterilización por Óxido de etileno", FUDESA, Noviembre 2002.
3. Christensen, E.A. and Kristensen, H. in: Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J.: "Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization", 2nd edition. Chapter 20: Gaseous Sterilization", p. 557. Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1992.
4. Gardner, J.F. and Peel, M.M.: "Introduction to Sterilization and Disinfection: Sterilization by gaseous chemicals". Edimburgh, Churchill Livingstone, 1991.
5. Phillips, J.J. and Kaye, S.: "The sterilizing action of gaseous ethylene oxide". Review. American Journal of Hygiene, Vol. 50, p. 270-279, 1949.
6. Ernst RR, Shull JJ. "Ethylene oxide gaseous sterilization. Influence of method of humidification". Applied Microbiology, vol. 10:p. 337-341, 1962.
7. EN ISO 11135-1: 2007: "Esterilización de productos sanitarios con óxido de etileno. Parte 1: Requisitos para el desarrollo, la validación y el control de rutina de un proceso de esterilización para productos sanitarios", 2007.
8. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) Standard 24:1999: "American National Standard for Automatic, General purpose ethylene oxide sterilizers and Ethylene oxide sterilant sources intended for use in health care facilities". Arlington, VA: AAMI, 1999.
9. EN 1422: 1998: "Sterilizers for medical purposes- Ethylene oxide sterilizers- Requirements and test methods". 1998
10. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) Standard 41:1999: "Ethylene oxide sterilization in health care facilities. Safety and Effectiveness". Arlington, VA: AAMI, 1999.
11. Resolución 102: 2008: "Directrices de organización y funcionamiento de Centrales de Esterilización y procesamiento de productos médicos en establecimientos de salud públicos y privados", p.12-13. Ministerio de Salud, 2008.
12. NFPA 560- "Standard for the Storage, Handling and Use of Ethylene Oxide for Sterilization and Fumigation". National Fire Protection Association, Quincy, M.A., 1996.
13. ISO 11138-2: 2006: "Sterilization of Health Care products. Biological Indicators. Parte 2: B.I. for Ethylene oxide sterilization processes", 2nd ed, 2006.
14. ISO 11140-1: 2005: "Sterilization of Health Care products. Chemical indicators. Parte 1: General"; 2nd ed, 2005.
15. Resolución 1547:2007: "Guía de procedimientos y Métodos de Esterilización y Desinfección para Establecimientos de salud públicos y privados", p.20-22. Ministerio de Salud, 2007.
16. ISO 10993-7: 2008: "Biological evaluation of medical devices- Ethylene oxide sterilization residuals". Second edition, Oct. 2008
17. Fowles, Jefferson: "Ethylene oxide in a food supplies: an assesments of health risks Reviews in Food and Nutrition toxicity", Ed. By Watson and Preedy, p. 350-353; 2004
18. International Agency for Research on Cancer (IARC): Summaries and Evaluations. Ethylene oxide (Group I). Vol. 60 p. 73, 1994.

Filtración esterilizante de fluidos

Mino Covo

- *Introducción*
- *Filtros de profundidad y filtros de superficie*
- *Mecanismos de la filtración esterilizante. Mitos y verdades sobre las membranas esterilizantes*
- *Ensayos de eficiencia bacteriológica*
- *Ensayos de los cartuchos de membrana y la carga de bacterias*
- *Bibliografía*

Introducción

A comienzos del siglo XX cuando las primeras soluciones parenterales se comienzan a producir en escala industrial llega la necesidad de un método para esterilizar productos sensibles al calor que no se puedan esterilizar en autoclave. Comienza entonces la filtración industrial.

En los primeros intentos se utilizaron cilindros de porcelana porosa (Chamberlain 1884, método ensayado por Luis Pasteur), pero dificultades en su limpieza, el peligro de la contaminación cruzada y su fragilidad llevaron a su reemplazo. A continuación en 1915 Schmitthenner utilizó placas de amianto y celulosa anticipando el uso de los filtros prensa. Zsigmondy entre 1914 y 1918 comenzó con ensayos de membranas que tuvieron desarrollo a partir de 1929 en Gottingen, Alemania, patentando su método que desarrolló asociado con Sartorius-Werke con la producción de los mismos en escala industrial.

El uso de las placas de amianto, celulosa en filtros prensa siguió en aplicación hasta 1975, año en que se las prohibió, tanto en bebidas como en soluciones inyectables, al eliminarse el uso del amianto por ser considerado cancerígeno. Cabe destacar que las placas de amianto tienen la ventaja de ser prácticamente esterilizantes por ser constituidas por fibras muy finas con alta carga electrostática positiva. Siendo filtros puramente de profundidad, retienen en su interior partículas de carga negativa tales como los microorganismos y los pirógenos con altísima eficiencia.

Si bien eran insustituibles antes que se produjeran los cartuchos de membrana, presentaban algunas desventajas, tales como la poca resistencia a las presiones diferenciales elevadas y la imposibilidad de hacerles un ensayo de integridad. Fueron fabricadas y comercializadas por Seitz-Werke, siendo el modelo Seitz Eks Filter, símbolo de placa esterilizante.

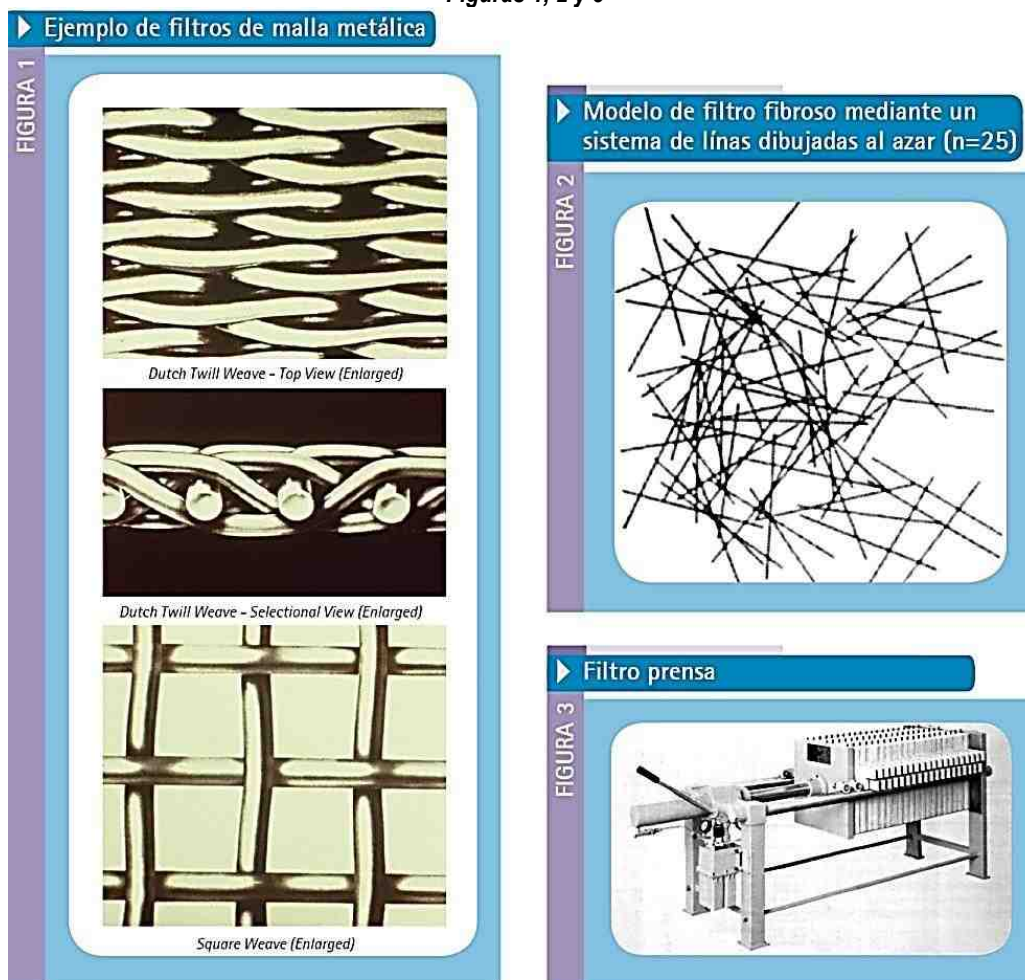
Filtros de profundidad y filtros de superficie

Veremos a continuación las diferencias fundamentales entre los filtros puramente de profundidad con los filtros llamados de superficie, aunque notaremos que hasta las membranas de grado esterilizante tiene efectos filtrantes en su espesor. Podríamos decir entonces que el único ejemplo de filtro de superficie es el tamiz, pues su espesor es despreciable comparado con la separación entre mallas. Llamaremos entonces filtros de profundidad a los filtros donde la retención de partículas se hace mayormente en su interior.

Por muchos años se clasificaron las membranas como filtros de superficie. El uso del nombre de “superficie”

para las mismas puede llevar a confusiones pues aunque gran parte de la filtración se realiza en su superficie, hay también retención de contaminantes en su interior, sea por estrechamiento del tamaño del poro o por fenómenos de atracción superficial. Queda entonces como ejemplo de filtro de superficie la malla metálica ilustrada en la Figura 1, pues las partículas quedan retenidas en su superficie por efecto tamiz no habiendo espesor como para retener las de menor tamaño por otros efectos.

Figuras 1, 2 y 3

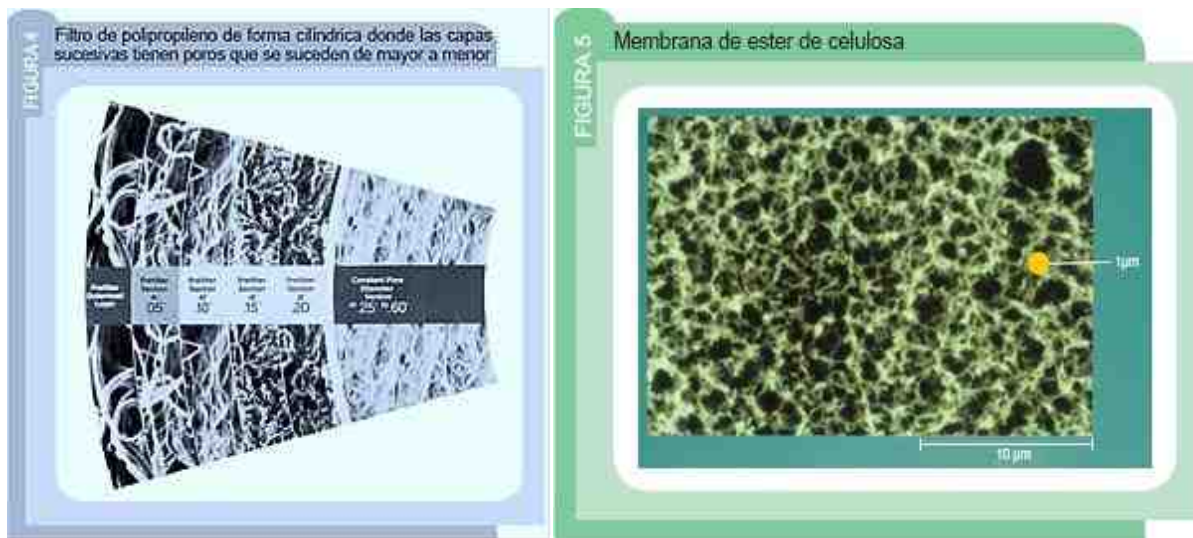


Los filtros de profundidad consisten de fibras depositadas entre sí al azar, que se mantienen unidas permanentemente por medio de adhesivos, fusión, entrecruzamiento, etc. Los intersticios entre fibras constituyen sus poros. La deposición al azar de sucesivas fibras sobre el manto inicial da como resultado una amplia dispersión de poro. Estos filtros tienen el potencial peligro de desprender fibras cuando aumentan las presiones diferenciales.

Las irregularidades en el manto de fibras reflejan su dispersión hecha al azar. Sin embargo su comportamiento mejora al superponer una manta sobre la otra en forma sucesiva (ver Figuras 2 y 3). Las tecnologías más recientes de dispersión de fibras sintéticas por medio de toberas de inyección producen filtros de profundidad por extrusión de polipropileno fundido. Estas toberas extruyen el polímero cuyos hilos son rodeados por aire caliente, sopladados, y recolectados sobre un cilindro rotativo. En función del tiempo, de la velocidad, del cilindro, y de la velocidad de desplazamiento de las toberas pueden obtenerse filtros con densidad progresiva de medio filtrante y con fibras más o menos finas.

En el cartucho de la Figura 4 se ve un filtro cilíndrico de polipropileno donde las capas sucesivas tienen poros que se suceden de mayor a menor. Las capas externas actúan como prefiltros de las capas internas. Pese a ser de profundidad, la matriz del medio filtrante se mantiene indeformable.

Figuras 4 y 5



Un material muy usado en la filtración fina, ultrafina y fundamentalmente en los procesos donde se deben retener microorganismos, es la membrana plástica, cuya producción industrial se ha desarrollado revolucionariamente desde 1957 hasta ahora, aunque los antecedentes experimentales de este material se remontan al siglo pasado. La palabra membrana no se limita a la definición que da el diccionario como “Hoja o capa fina, blanda y plegable de origen animal o vegetal”, ya que en la actualidad se producen muchas estructuras finas microporosas sintéticas compuestas por distintos polímeros

Si bien el desarrollo moderno de las membranas plásticas comenzó alrededor de 1910, algunos investigadores en el siglo pasado y más precisamente en 1840, comenzaron a usar vejigas de cerdos, pericardios vacunos y pieles de cebollas para experimentos osmóticos, diálisis y otros ensayos.

Matteucci y Cima en 1845 fueron los primeros en informar sobre diferencias de permeabilidad relacionadas con la simetría de los poros en membranas animales.

El colodion es el término comúnmente usado por polímeros de la celulosa y consiste en una solución de nitrocelulosa en una mezcla de éter y alcohol o en una mezcla de ácido acético y acetona. Todos los primeros intentos de fabricar membranas de colodión se basaban en la disolución de nitrocelulosa en un solvente, siendo luego vertida en forma de película delgada y plana, formándose un gel con la evaporación de los solventes volátiles. La estructura de los poros se controlaba por el tiempo durante el cual se evaporan los solventes, operación que se interrumpía al lavar esa película con agua.

En 1872 Baranetzky fabricó finas películas de colodión soportadas por papel, vertiendo el colodión sobre planchas de vidrio. Bechhold mejoró el método de Baranetzky haciendo hojas planas de filtros de membranas, impregnando papeles de filtro con colodión disuelto en ácido acético. Halló que la permeabilidad es inversamente proporcional a la concentración de colodión e intentó definir una manera de estimar tamaños de poros y permeabilidad, midiendo la presión necesaria para impulsar aire a través de membranas cuyos poros se hallaban totalmente inundados por agua. Así fue el precursor del ensayo del punto de burbuja que veremos más adelante.

En 1918 Zsigmondy y Bachmann desarrollaron el proceso de verter finas capas de colodión, éter y alcohol sobre vidrios planos, regulando la formación del tamaño de poro al controlar el tiempo de evaporación del solvente durante la etapa de secado. Zsigmondy, siendo Director del Instituto de Química Coloidal de la Universidad de Gottingen, usó celulosa y ésteres de celulosa con los mismos ingredientes básicos que los precursores habían usado para producir membranas de colodión. Mezcló la dilución de derivados de celulosa en un solvente al cual agregó agua insoluble en la solución, regulando la evaporación de los solventes mediante un lento pasaje de aire en cantidades conocidas y en condiciones de humedad y temperatura controladas.

La empresa Sartorius Werke en Gottingen, de Alemania, desarrolló en forma más completa el proceso de Zsigmondy, y en 1917 comenzó la producción de filtros de membrana en pequeña escala siendo hasta hoy en

día Sartorius Werke, una división de la empresa iniciadora, fabricante de filtros.

Figuras 6, 7 y 8



Durante la Segunda Guerra Mundial los alemanes desarrollaron estas membranas para detección de bacterias coliformes y la consecuente enterocontaminación de agua potable. Después de la guerra la tecnología fue trasladada por el ejército de los Estados Unidos a Fort Dietrick-Maryland, y perfeccionada. Su explotación comercial en EE.UU. se debió a la transferencia de dicha tecnología a una compañía privada.

En el proceso de producción se extrae de la solución del polímero ciertos materiales volátiles cuando una capa fina de solución se desplaza a través de una cámara de ambiente controlado. El resultado es una hoja de material de unos 150 micrones (μ) que tiene una bien definida estructura microporosa como se ve en la Figura 5 (membrana de éster de celulosa). Es de destacar la estructura tridimensional y, muy importante, su gran porcentaje de área abierta (aproximadamente un 80 % de la misma). No se ven poros cilíndricos, pero pese a esas irregularidades el medio funciona como un filtro absoluto, que es uno que depende especialmente del efecto tamiz o de intercepción directa como mecanismo de retención y tiene una excelente integridad.

En función de que polímero se use, un amplio rango de compatibilidad química y térmica puede ser obtenido. El éster de celulosa sin embargo, fue uno de los polímeros más usados para filtración esterilizante. En la actualidad, se siguen fabricando membranas de variedades de ésteres de celulosa y de polímeros sintéticos.

El problema que se encuentra con los ésteres de celulosa es su baja resistencia mecánica al plisado profundo, necesario para la producción de cartuchos corrugados, usados actualmente para lograr grandes caudales.

Una membrana utilizada especialmente para la fabricación de cartuchos fue la de microfilamentos inorgánicos, cuya fabricación consistió en la dispersión controlada de microfilamentos soldados entre sí en sus puntos de contacto, llegándose a una estructura indeformable de material cristalino como se ve en la Figura 6. Fue desarrollada al principio de la década del 60, para la fabricación de cartuchos corrugados y su apariencia era la de un filtro de profundidad. Fue discontinuada después de algunos años de uso exitoso pues sobre su materia prima, titanato de potasio, hubo un principio de cuestionamiento de la FDA.

Una variedad de otros polímeros tales como el teflón y el nylon 66, el PVDF, y la poliétersulfona, son usados de manera tal de

formar un medio filtrante similar en su estructura al éster de celulosa. Todos ellos admiten ser corrugados profundamente por su alta resistencia mecánica, admitiendo asimismo la esterilización por vapor fluyente, ventaja sumamente importante sobre las membranas de ésteres de celulosa que no resisten el reiterado uso de vapor vivo.

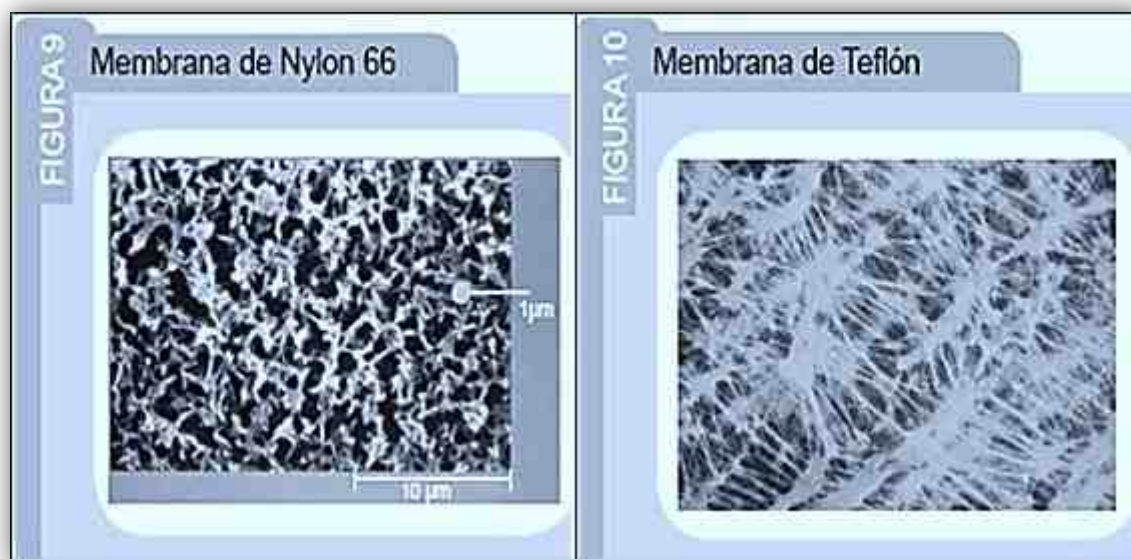
Para ejemplificar la importancia de la corrugación de membranas con las que se construyen filtros industriales, debemos mencionar que un elemento de cartucho de 25 cm de longitud y unos 60 mm de diámetro puede tener un área de membrana de hasta 0,9 m², por la que pueden circular caudales de soluciones acuosas de 15 l/min. Comparando esta estructura a las membranas de polímeros plásticos se nota una gran similitud en la regularidad de los volúmenes abiertos, en ambos casos aproximadamente 80 a 85% del volumen total y una similitud en la

tortuosidad del recorrido que deberá hacer el fluido, no habiendo perforaciones directas o poros.

Otra membrana de desarrollo muy interesante es la membrana nuclear. Esta es una de las más interesantes de las estructuras filtrantes porosas, y es la única que tiene capilares cilíndricos perfectos como contrapartida de las membranas vistas previamente. En su proceso de manufactura la película de policarbonato es sometida a un bombardeo de núcleos atómicos en un reactor nuclear. Las partículas que atraviesan la película dejan huellas residuales que pueden ser atacadas por agentes químicos, en función del tiempo de exposición de la membrana al hidróxido de sodio. El resultado son los capilares cuyo diámetro es función directa del tiempo de exposición al ataque químico, siendo su número función del tiempo de residencia de la película de policarbonato en el reactor (Figura 7). Dado que el bombardeo de partículas nucleares es sin ninguna duda desordenado por naturaleza, uno podría suponer una probabilidad razonable de coincidencia de impactos en zonas contiguas, con lo que la posibilidad de poros sobredimensionados aumenta y, en consecuencia, la posibilidad de pérdida de eficiencia de retención, aunque este efecto puede ser mitigado debido a los diferentes ángulos de incidencia de las partículas nucleares. La membrana resultante es extremadamente fina y resistente. Su apariencia es translúcida y tiene una superficie lisa que la hace especialmente apta para trabajos de estudio al microscopio. Para disminuir la posibilidad de coincidencias de impacto puede bajarse el tiempo de exposición de la película al bombardeo nuclear, lo que implica menor caudal por unidad de superficie que las otras membranas, al disminuirse el volumen abierto. En el caso de la membrana nuclear el volumen abierto es por la razón antedicha del 20% del volumen total, lo que relega su uso al de membranas analíticas, por ser sumamente claras y lisas, aunque los caudales son relativamente bajos (Figura 8).

A partir de 1980 los filtros de membranas de Polihexametileno adipamida (comúnmente llamado nylon 66) se utilizan en forma cada vez más intensa debido a su amplia compatibilidad química y resistencia mecánica y térmica (Figura 9). La membrana de nylon tiene como desventaja el absorber algunos productos en solución. Para algunas aplicaciones esta membrana lleva un soporte de material no tejido como sustrato, de manera tal de tener resistencia a la tracción así como una mayor resistencia cuando se la pliega en la fabricación de cartuchos.

En 1981 se desarrollan las membranas de Difluoruro de Polivinilideno que tienen un alto rango de compatibilidad química y admiten el plisado profundo por lo que se pueden construir cartuchos de gran superficie con ellas. Las membranas de PES (poliétersulfona) tienen grandes ventajas por tener alta compatibilidad química y física y presentar poca adsorción de los materiales a filtrar.



Figuras 9 y 10

Queremos destacar que la membrana de teflón, cuya fotografía se ilustra en la Figura 10, se fabrica por el método de estiramiento que consiste en tensionar una película plástica densa de teflón que es estirada en todas las direcciones bajo condiciones controladas, de tracción. Como resultado del estiramiento se forman poros en la

película plástica cuyo tamaño se controla acotando las tensiones y tiempos con los que este proceso se efectúa. La membrana de teflón, siendo hidrofóbica, es usada principalmente en la filtración de aire en venteos, aire comprimido y gases, o en la de fluidos muy agresivos.

Debemos enfatizar la importancia que ha adquirido en la industria moderna la necesidad de contar con elementos de este tipo, pues en innumerables aplicaciones de la industria farmacéutica, microelectrónica, de fermentación y alimenticia es necesario contar con la provisión de fluidos estériles en caudales importantes. Tenemos en nuestro país casos típicos de filtración de fluidos, en rangos submicrónicos de retención absoluta, con caudales de hasta 30 m³/h. La única forma simple en que se puede efectuar el filtrado de dichos caudales es por medio de carcasas con múltiples cartuchos dispuestos en paralelo.

Mecanismos de la Filtración Esterilizante. Mitos y verdades sobre las membranas esterilizantes.

Bajo mitos sobre los filtros esterilizantes hemos resumido los siguientes puntos que, como veremos a continuación, no son ciertos como se creía.

- 1) “*Todo producto filtrado por un filtro esterilizante será necesariamente estéril*”. Existiendo microorganismos inferiores en tamaño a *Brevundimonas diminuta*, los filtros esterilizantes validados con las mismas pueden ser penetrados por bacterias menores, como *Burkholderia cepacia* y las *Leptospiras*.
- 2) “*El filtro esterilizante es eficiente independientemente de la carga bacteriana*.” Si la carga bacteriana superara las 10⁷ /cm² no se puede garantizar la esterilidad del efluente.
- 3) “*El filtro esterilizante tiene todos los poros de 0,2 micrones*”. El punto de burbuja de los filtros de 0,2 micrones varía entre 3 y 4 bar que corresponde a poros de 0,8 a 1 micrón. El punto de burbuja del capilar de 0,2 micrones es de 13 bar por lo tanto existen poros de hasta 1 micrón.
- 4) “*Todo filtro de 0,2 micrones es esterilizante*”. Absolutamente NO. Un filtro esterilizante debe ser identificado por documentos que comprueben que fue calificado por el fabricante con un desafío bacteriológico según la norma ASTM F838-05 y recomendaciones de la FDA. La definición de filtro esterilizante por FDA no menciona micrones.
- 5) “*Cualquier filtro esterilizante disponible en el mercado es aceptable*”. No necesariamente. El filtro esterilizante debe ser seleccionado en base a las características del producto y bajo las condiciones del proceso

Por mucho tiempo se divulgó el concepto de que las membranas esterilizantes de diferentes polímeros eran tamices perfectos con tamaños de 0,2 o 0,22 μ de poro. Sin embargo, ninguna de estas membranas tiene poros o capilares perfectos de ese tamaño, aunque tiene muchos de tamaños inferiores o similares. Más aún, todas las membranas utilizadas en la industria como esterilizantes tienen poros y capilares distintos, algunos de los cuales superan el tamaño del micrón y sin embargo son esterilizantes, o mejor dicho en la práctica dan efluente estéril. Esta capacidad de esterilizar por filtración está sin embargo limitada por la concentración de bacterias por unidad de volumen de fluido a filtrar y por el espesor de las membranas.

En 1972, Jacobs publicó un trabajo en la revista *Filtration and Separation* (1) donde demostraba que la presión de punto de burbuja de 45 psi con la que se efectuaba el ensayo de integridad de las membranas de 0,2 micrones correspondía a un capilar de 0,8 μ .

Ensayos de eficiencia bacteriológica

A continuación se discute el concepto de que las membranas no son absolutas ni son solamente de superficie, sino que se evalúan por su capacidad de disminuir las cargas bacterianas, hasta el punto de definir las como esterilizantes

El principal mecanismo por el cual las partículas son retenidas en las membranas es el efecto tamiz o de intercepción directa, que es el más importante y otros efectos hacen que partículas se desprendan del medio fluido para depositarse sobre la superficie de la fibra o capilar donde quedan retenidas por adsorción. La adsorción de partículas por la membrana depende de varios factores, como la presión diferencial, la velocidad de pasaje, pH, etc. La mejor manera de verificar si un filtro de membrana puede producir un efluente estéril es

desafiarlo con un gran número de microorganismos y verificar su retención. Este método es un ensayo destructivo que deja el filtro contaminado con microorganismos y cercano al punto de saturación.

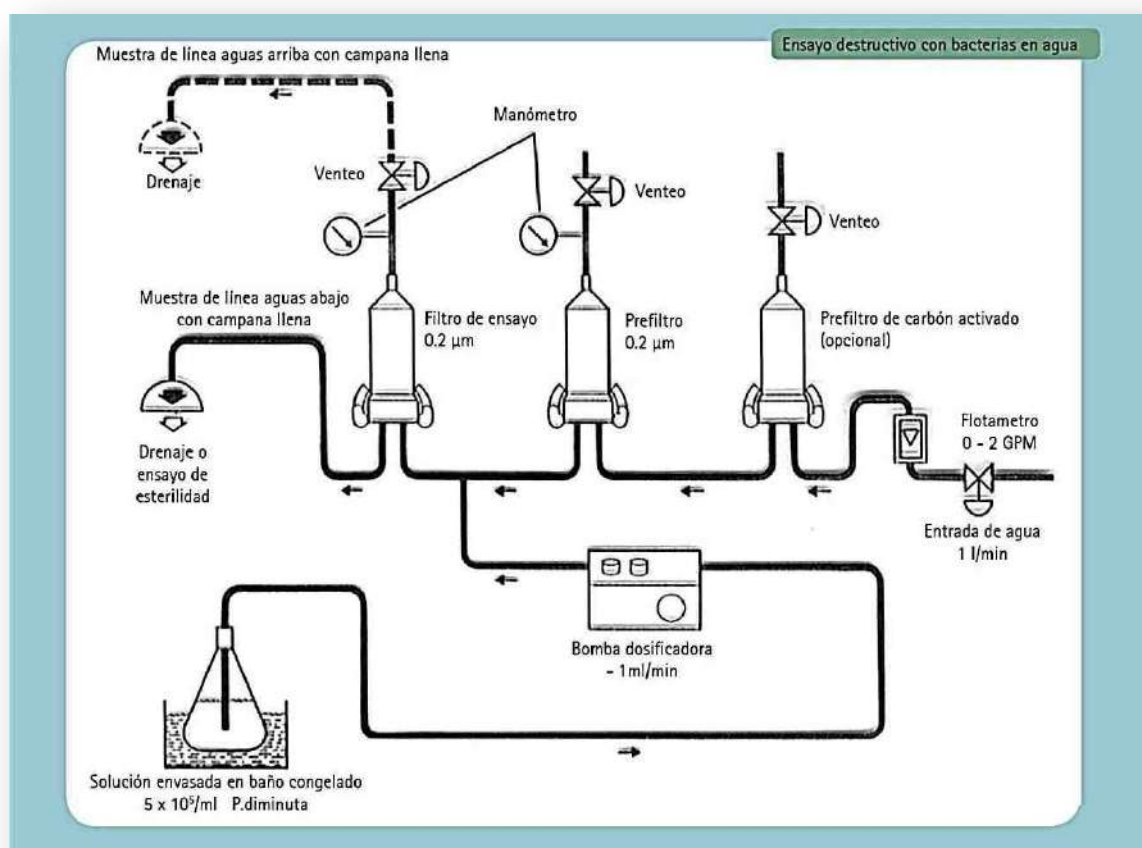
Ensayo con soluciones acuosas

Un ensayo destructivo, usado típicamente en la evaluación de la eficiencia de filtros de membrana, es el de la suspensión de bacterias. Las membranas de $0,2$ ó $0,22 \mu$ de tamaño de poro se ensayan con la bacteria de menor tamaño comercialmente disponible que es la *Brevundimona diminuta*, de un tamaño aproximado a $0,3 \mu \times 1 \mu$ en una suspensión en agua con concentraciones de 2×10^5 a 5×10^5 microorganismos por litro, mientras que las membranas de $0,45 \mu$ de poro, se ensayan con suspensiones de *Serratia marcescens*. En la Figura 11 vemos la representación esquemática del circuito de ensayo de cartuchos de membranas de $0,2 \mu$ de poro.

Una solución con una concentración de 5×10^5 *Brevundimonas diminuta* / ml se inyecta a razón de 1 ml/ min a un caudal de agua corriente limpia, desprovista de partículas contaminantes y de cloro, que se bombea a razón de 1 lt/ min hacia el filtro a ensayar. Esta agua se obtiene eliminando primero el cloro por medio de carbón activado y luego eliminando las partículas y bacterias por medio de un prefiltro de $0,2 \mu$ con lo que se inyecta al filtro a ensayar una solución de *Brevundimonas* en agua con una concentración de 5×10^5 microorganismos/litro.

Agua con la concentración arriba escrita se inyecta en forma continua al filtro por un periodo de 2 a 4 semanas hasta el punto de saturación, cuando el caudal de 1 lt/ min no puede ser mantenido y la caída de presión llega a 60 PSI (aproximadamente 4 kg/ cm²). Se toman muestras del agua efluente a la salida del filtro, muestras que son cultivadas en medios de cultivo. El efluente debe ser continuamente estéril has el punto de saturación inclusive.

Figura 11. Representación esquemática del sistema de ensayo de cartuchos por bacterias.



Téngase en cuenta que al nivel de saturación la membrana de $0,2 \mu$ tiene sobre su superficie entre 10^{11} y 10^{12} *Brevundimonas* por pie², es decir aproximadamente entre 10^8 a 10^9 ufc /cm² (Ver Figura 11, ensayo destructivo). Sin embargo, es posible ensayar la habilidad de un filtro para ser esterilizante por medio de ensayos no destructivos, correlacionados con los de retención microbiana.

Probabilidad de retención con desafíos de cargas bacterianas

En los casos en que no todos los poros tengan tamaños o estrechamientos que funcionan como tamices, el resultado depende de la probabilidad, pues la captura de la partícula o microorganismo depende de los efectos de inercia, puente, adsorción y velocidad de paso o tiempo de permanencia del microorganismo en el seno de la membrana. Cuanto mayor sea la carga de bacterias por unidad de superficie del filtro, mayor es la probabilidad de penetración. Y a la inversa, cuanto menor es la cantidad de microorganismos menor dicha probabilidad.

Los efectos de la presión diferencial deben ser tenidos en cuenta. Cuanto mayor el tiempo de permanencia del microorganismo dentro del espesor de la membrana, mayor la probabilidad de ser retenida por adsorción. A la inversa, a mayores presiones diferenciales la velocidad de paso será mayor y menor el tiempo de permanencia con lo que disminuirá la probabilidad de ser retenido por adsorción. Por lo tanto la retención por adsorción es probabilística, existiendo una relación inversa entre probabilidad de retención por adsorción con la presión diferencial.

Factor de la carga de microorganismos

La carga de microorganismos por unidad de superficie de filtro afecta la posibilidad de penetración. Por esta razón la carga bacteriana debe ser mantenida tan baja como sea posible. Los filtros tienen eficiencia máxima cuando la carga es mínima. Esta carga deberá ser monitoreada regularmente.

Un factor muy importante es la existencia de poros de tamaños mayores que los microorganismos, que no tienen estrechamiento menores durante la extensión de su capilar. Veremos que mediante el aumento del espesor de la membrana podemos hacer que la cantidad porcentual de dichos poros sea mínima, y tan pequeña como se quiera la probabilidad de penetración.

Ensayo de reducción de concentración de bacterias

Llamaremos Tr a la reducción de concentración, como la relación entre la cantidad de bacterias aguas arriba y aguas abajo del filtro, y su expresión simplificada como LRV que significa el logaritmo en base 10 de Tr .

Figura 12: Reducción de título y valor de reducción log.

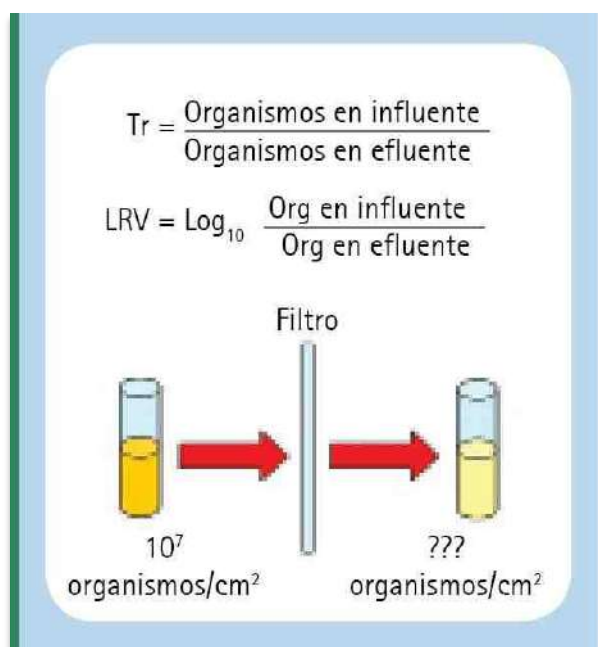
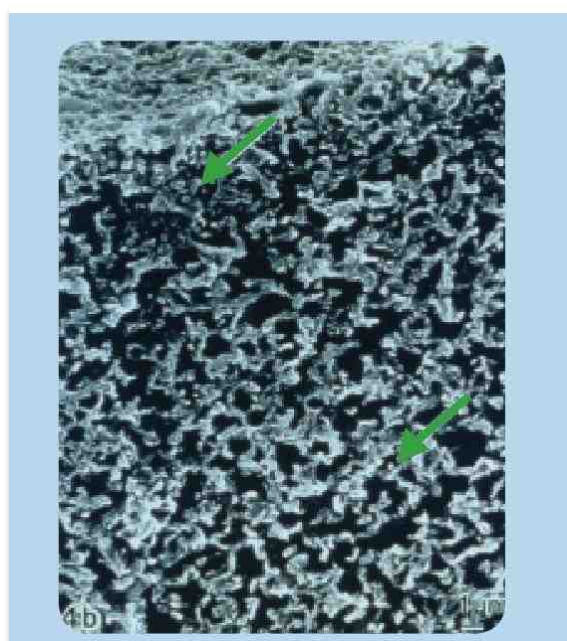


Figura 13. Membrana PVDF con carga de 5×10^8 ufc



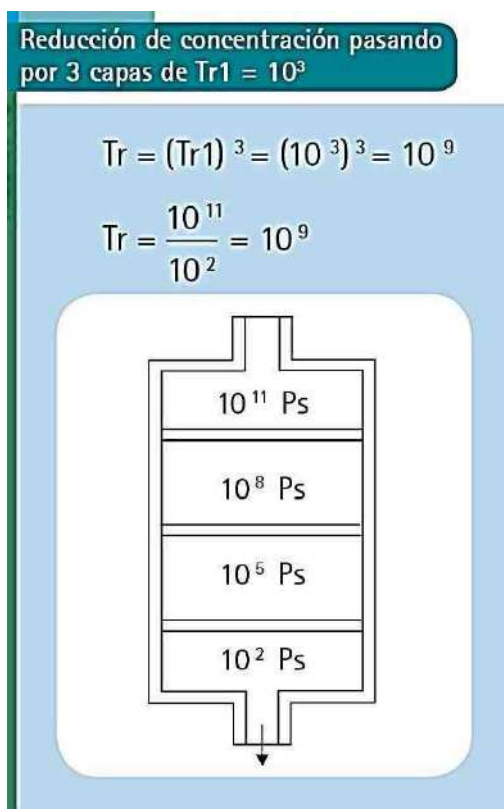
Para una reducción $Tr = 10^7$, $LRV = 7$ que *B. diminuta* define el filtro esterilizante (Figura 12). Podrá observarse en la fotografía de la Figura 13 que las bacterias que penetran los filtros en su espesor son capturadas a distancias entre 6 y 30 μ de la superficie de entrada. En esta fotografía tomada con microscopio electrónico de barrido se muestra la superficie y sección de una membrana de PVDF de 0,2 μ desafiada con una carga de (falta formula) *Brevundimonas diminuta* por cm², y 2 puntos en su sección a los que llegaron bacterias. En junio de 1978 los Dres. Pall y Kimbauer (2) presentaron un trabajo fundamental en el que demostraron que no

habiendo membrana perfecta se podía lograr que la probabilidad de penetración de una sola bacteria puede hacerse tan pequeña como se quiera. Para ello consideraron que las membranas estaban constituidas por capas elementales de 25 μ de espesor; debido a que la mayoría de las membranas tienen espesores múltiplos de 25 μ (125-200 μ).

Con un desafío de 10^{11} bacterias /pie² de superficie de cartucho o aprox. 10^8 /cm², puede ser detectado hasta un microorganismo en el efluente.

Se selecciona *Brevundimonas diminuta* por ser el microorganismo de menor tamaño y aceptado generalmente por la industria. Se considera que en membranas como la tomada en este ejemplo que es de nylon 66 de 0,2 μ , la relación Tr se mantiene constante independientemente de la concentración de bacterias en el influente. Podremos decir entonces para simplificar la deducción que la membrana está compuesta por un número de capas de 25 micrones superpuestas tal que si llamamos Tr1 la reducción de concentración de una capa elemental tendremos para 2 capas que $Tr = Tr1^2$ para 3 capas $Tr = Tr1^3$ y para n capas $Tr = Tr1^n$

Figuras 14 y 15.



En la Figura 14 se ve una carga de *B. diminuta* de 10^{11} y 3 capas elementales cada una de ellas con una reducción $Tr1 = 10^3$ que reducen la carga de bacterias sucesivamente a 10^8 , 10^5 y 10^2 . Lo anterior nos muestra una membrana de espesor insuficiente para ser esterilizante. Si su espesor fuera el doble $Tr = Tr1^6$, la probabilidad de penetración sería entonces:

$$10^{11} / 10^{18} = 1 / 10^7 = 10^{-7}$$

Luego LRV = -7, reducción considerada más que suficiente para ser esterilizante

Usando la ecuación anterior en un ensayo de reducción de bacterias en una membrana de un espesor determinado, podremos calcular su $Tr1$ para predecir el comportamiento de varias membranas del mismo material pero de distinto espesor. Por ejemplo, una membrana de 100 μ es decir de 4 capas elementales de 25 μ que exhiban una reducción de concentración de $Tr = 10^6$.

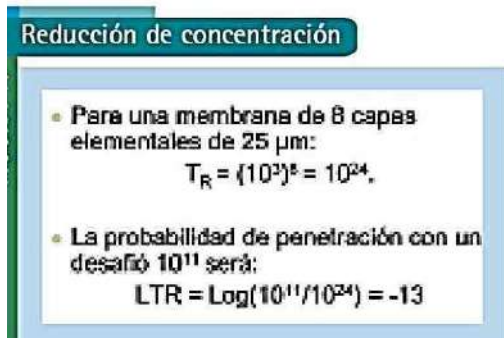
$$Tr1 = (10^6)^{1/4}$$

Si consideramos una membrana de 8 capas, $Tr = Tr1^8 = 10^{12}$. Este ejemplo lo damos con el mero propósito de mostrar cómo se hace el cálculo de reducción de concentración total. También llegaríamos al mismo resultado en forma más simple, de la siguiente manera: considerando que 10^6 es una reducción de concentración insuficiente para una membrana esterilizante por permitir una penetración inaceptable, consideremos la colocación de 2 capas del mismo medio en serie:

$$Tr = (10^6)^2 = 10^{12}$$

que es aceptable en soluciones parenterales.

El ejemplo anterior está dado con el mero propósito de mostrar cómo se hace el cálculo de la reducción Tr basado en $Tr1$, pero debo alertar que los valores mostrados son muy inferiores a los reales. $Tr1 = 31,6$ es muy inferior a los valores reales para



membranas esterilizantes de 0,2 μ .

Hay un límite máximo práctico en cuanto al número de microorganismos con los cuales se puede ensayar un filtro. Cuando alrededor de 5×10^9 /cm² (5×10^{12} /pie²) de *B. diminuta* son retenidas sobre la superficie del filtro, la permeabilidad de éste ha bajado al mínimo. Por ejemplo, si en un cartucho de nylon de 5 pies² se mantuviera

desde el inicio de la filtración a 60 psi (menor o igual 4 Kg/cm² tendría inicialmente un caudal a filtro limpio de 200 l/min, pero el caudal bajará a menos de 50 cm³/min para cuando 5 x 10⁹ /cm² *B.diminuta* se hayan recolectado.

Para cualquier membrana de nylon 66 de 0,2 μ, sabiendo que su reducción es Tr1 = 7,7 x 10³ y para un espesor de 150 μ, tendremos:

$$Tr = Tr1^6 = (7,7 \times 10^3)^6 = 2 \times 10^{23}$$

Si consideramos su saturación a 2 x 10¹³ *Brevundimonas diminuta* por cartucho de 5 pies², la probabilidad de penetración de una sola bacteria filtro saturado será de:

$$(2 \times 10^{13}) / (2 \times 10^{23}) = 1 / 10^{10} = 10^{-10}$$

luego LRV= -10

Número de bacterias para el ensayo

El procedimiento de ensayos con desafío bacteriano es uno con el cual se evalúan los filtros de 0,2 micrones y varía con cada proveedor de filtros. Algunos argumentan que ensayar los filtros con más de 5 x 10⁷ CFU/cm² de *B. diminuta* cubriría la superficie de la membrana formando una capa. Los Dres. Osumi, Yamada y Toya (3) en 1996 demostraron con fotografías con microscopio electrónico que aún con una carga 50 veces mayor que la norma, la superficie no estará completamente cubierta.

Clasificar los filtros de membrana por un rango de eficiencia, no significa tamaño de poro sino rango de eliminación de contaminantes específicos. Por ejemplo:

0.45 μ: *Serratia marcescens*

0.2 μ: *Brevundimonas. diminuta*

0.1 μ: *Acholeplasma laidlawii*

Para determinar si los filtros cumplen los requerimientos mínimos de la FDA, deberán ser usados desafíos mayores. Repetimos una vez más que la eficiencia de retención bacteriana de una membrana está basada en la probabilidad.

El índice que muestra la eficiencia de retención en bacterias Tr se expresa como la relación de concentración de bacterias en el influente con la concentración en el efluente. Este valor refiere a la probabilidad de que una sola célula microbiana penetre la membrana, representando la eficiencia de retención del filtro. También puede representarse como:

$$\text{Eficiencia} = (Tr - 1) / Tr$$

Por ejemplo, si tuviésemos un desafío de bacterias de 10⁹ CFU y una concentración de 10 CFU aguas abajo la relación

$$Tr = 10^9 / 10 = 10^8$$

lo que significa que la probabilidad de que una sola bacteria penetre es de 0,000001 % y la eficiencia de retención es del 99,999999 %.

Conclusiones del trabajo del Dr. Osumi

- 1) Aún cuando una membrana de 0,2μ sea desafiada a niveles bien superiores a 10⁷ cfu/cm² la superficie de la membrana no se cubre totalmente con una capa de células microbianas 5 x 10⁸/cm².
- 2) La totalidad de las bacterias no fue retenida en la superficie, pero las bacterias no penetraron la membrana a más de 30 μ de distancia de la superficie de la misma.
- 3) El mecanismo de retención microbiana de los filtros esterilizantes de membrana es una consecuencia del

efecto tamiz de múltiples capas superpuestas más que un simple efecto superficial.

Si se tiene en cuenta que por definición de la FDA, filtro esterilizante es el que con una carga de 5×10^7 microorganismos /cm² da un efluente estéril. Los experimentos del Dr. Osumi muestran que las membranas ensayadas la cumplen ampliamente.

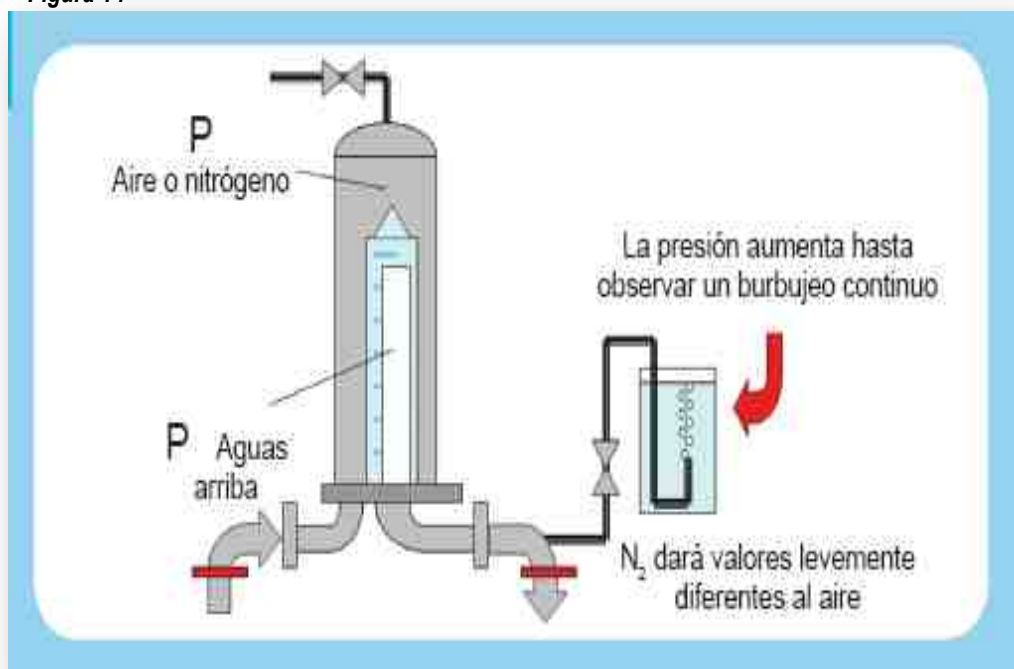
El concepto de la membrana actuando únicamente como tamiz superficial es incorrecto. La eficiencia del filtro de membrana depende tanto de los tamaños de los poros como del espesor, expresado por la ecuación exponencial que relaciona el mismo, con la eficiencia de la lámina de espesor elemental. Es entonces posible desarrollar membranas en la que la probabilidad de penetración sea tan baja, como se quiera.

Ensayos de los cartuchos de membrana y la carga de bacterias

Filtro esterilizante (FDA 1987) (4): Un filtro que, desafiado con una carga de *Brevundimonas diminuta*, con una concentración mínima de 10^7 /cm² de superficie de filtro, producirá un efluente estéril.

La necesidad de contar con un método simple para el ensayo de integridad de las membranas de grado esterilizante llevó a utilizar una propiedad de las mallas porosas, que se llamó punto de burbuja, y que posibilita verificar tamaños de poro con pocos elementos de laboratorio.

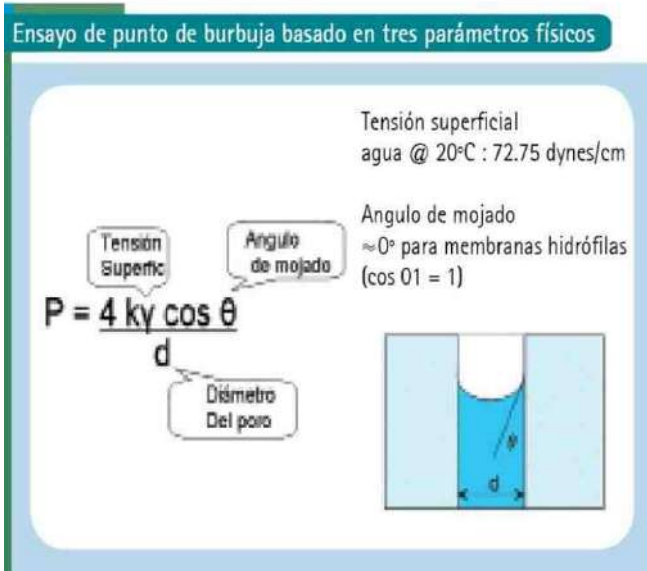
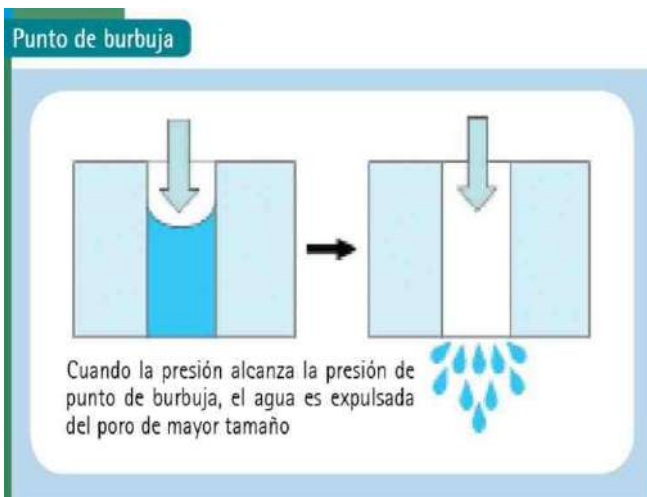
Figura 14



Ensayo de punto de burbuja

Si se moja una malla porosa, metal poroso sinterizado, membrana, etc., de manera tal que todos sus poros se encuentren inundados y se la somete a una gradual presión de gas (aire) se llegará a un punto en el que el aire desplazará el agua del poro de mayor tamaño, y se podrá notar un burbujeo continuo (Figura 14). Este punto se llama punto de burbuja y permite relacionar el tamaño de poro con la presión a la que aparece el primer burbujeo continuo. Esta presión obedece a una fórmula donde influyen no sólo la presión y el tamaño del poro, sino la tensión superficial y el ángulo de contacto del menisco líquido, que depende de la naturaleza del material filtrante así como del líquido (Figuras 15 y 16) de donde podemos, conociendo la tensión superficial y el ángulo de contacto del menisco líquido el tamaño del poro ya que $P = cte/d$, cuando ensayamos materiales de iguales composiciones con el mismo líquido, por ejemplo agua.

Figuras 15 y 16



Las membranas validadas como esterilizantes de 0.22 y 0.2 micrones tienen puntos de burbuja mojados con agua que fluctúan entre 40 y 50 psi (libras por pulgada²), es decir cerca de los 2.8 kg/cm² y 3.6 kg cm² respectivamente.

Es importante destacar que estas membranas no tienen poros uniformes que actúan como tamices perfectos. Tienen en su superficie poros de hasta 1 micrón y sin embargo retienen en un 100% bacterias como las *B. diminuta*, que se consideran de 0,2 μ por ser de tamaño entre 0.3 y 0.6 μ . Es decir se los llama esterilizantes de 0.2-0,22 μ por su eficiencia de retención en dichos tamaños y no por su tamaño de poro. La existencia de poros de tamaño de 0.80 a 1 μ ha sido documentada por Jacobs (1) quien encontró que a esos tamaños correspondían puntos de burbuja de entre 40 y 50 psi. Si los filtros fueran de poros de máximo tamaño de 0.2 μ les correspondería un punto de burbuja de 190 psi (Figura 17).

Hay razones para que dichos filtros se comporten como esterilizantes:

1) Los mecanismos de la filtración no son sólo por efecto tamiz, sino influyen también los efectos de inercia y difusión browniana (aunque esto último es fundamental para separación de partículas en gases, no en líquidos).

2) El recorrido largo y tortuoso que debe recorrer la partícula o bacteria a través del espesor de la membrana varía entre 150 y 200 micrones. Estos recorridos tortuosos son

superiores entre 1000 y 2000 veces el tamaño de la bacteria.

3) Además de los efectos de retención por inercia hay situaciones de efecto puente. Dos partículas apoyadas una contra otra bloquean el poro (Figura 18) de mayor tamaño. Efectos de atracción electrostática o fuerzas de Van der Waals adhieren a partículas o bacterias a la superficie del capilar disminuyendo además la sección de pasaje (Figura 19).

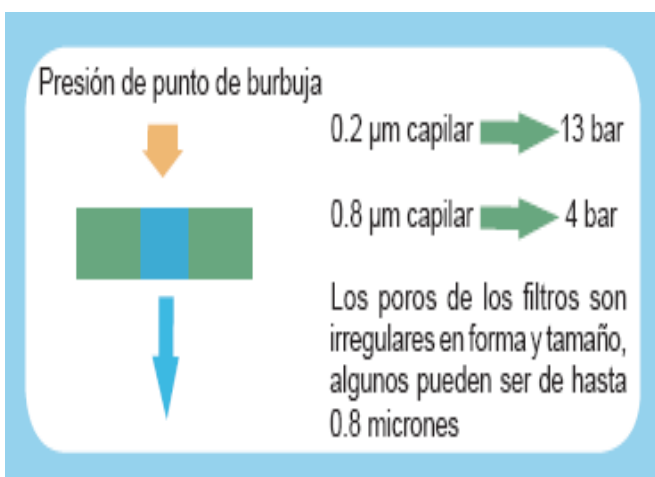


Figura 17

El punto de burbuja manual presenta algunos problemas de interpretación por cuanto depende de la agudeza de la vista del operador, además de otros factores, como la superficie de la membrana en el filtro en ensayo. Debe tenerse en cuenta que cuando previo al ensayo la membrana se sumerge en el fluido se llena con líquido un mínimo del 70% de su volumen. La membrana soporta efectivamente una película líquida. Cuando se aplica aire a presión aún a presiones bajas, el aire en pequeños caudales se difunde a través de los capilares en cantidades imperceptibles al ojo humano cuando se ensaya un filtro de poca superficie (discos de 142 mm ó 293 mm).

En 1975 el Dr. David Pall (5) presentó un trabajo a la PDA donde demostraba que podía usarse un método basado en el flujo difusivo, para certificar la integridad de los cartuchos de membrana, correlacionando los valores de éste con los ensayos destructivos con bacterias. Este método llamado por su autor de "Forward Flow", o flujo anticipado al punto de burbuja, provino de observar con microscopio la superficie de cartuchos sumergidos, a los que se daba presión de aire por su núcleo (Figura 20). Con ayuda óptica se detectaron burbujitas a presiones muy inferiores al punto de burbuja. El fenómeno, llamado de flujo difusivo, consiste en la corriente de aire disuelto en el líquido que se desplaza o difunde a través del mismo.

Dos partículas apoyadas una contra otra bloquean el poro de mayor tamaño



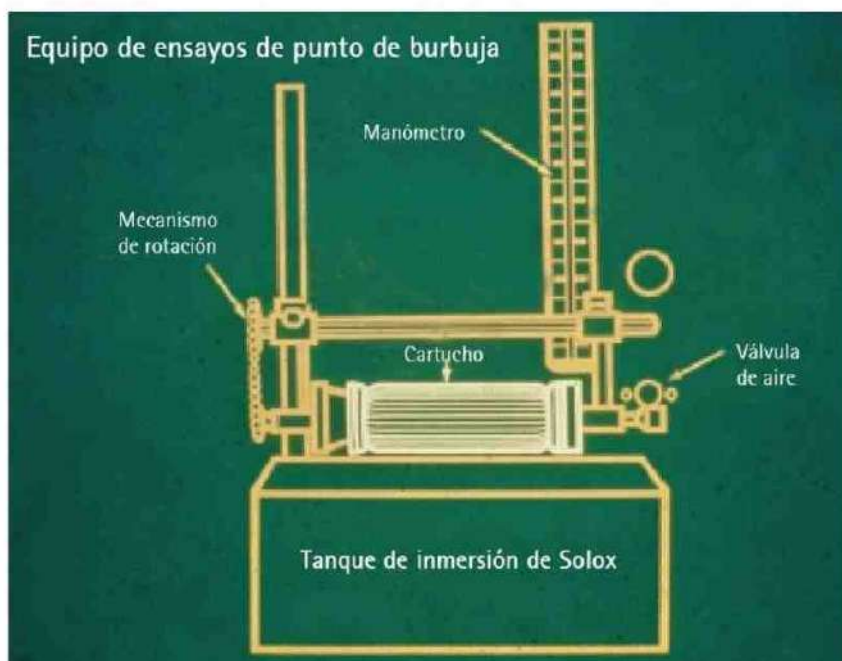
Efectos de atracción electrostática o Fuerzas de Van der Waals



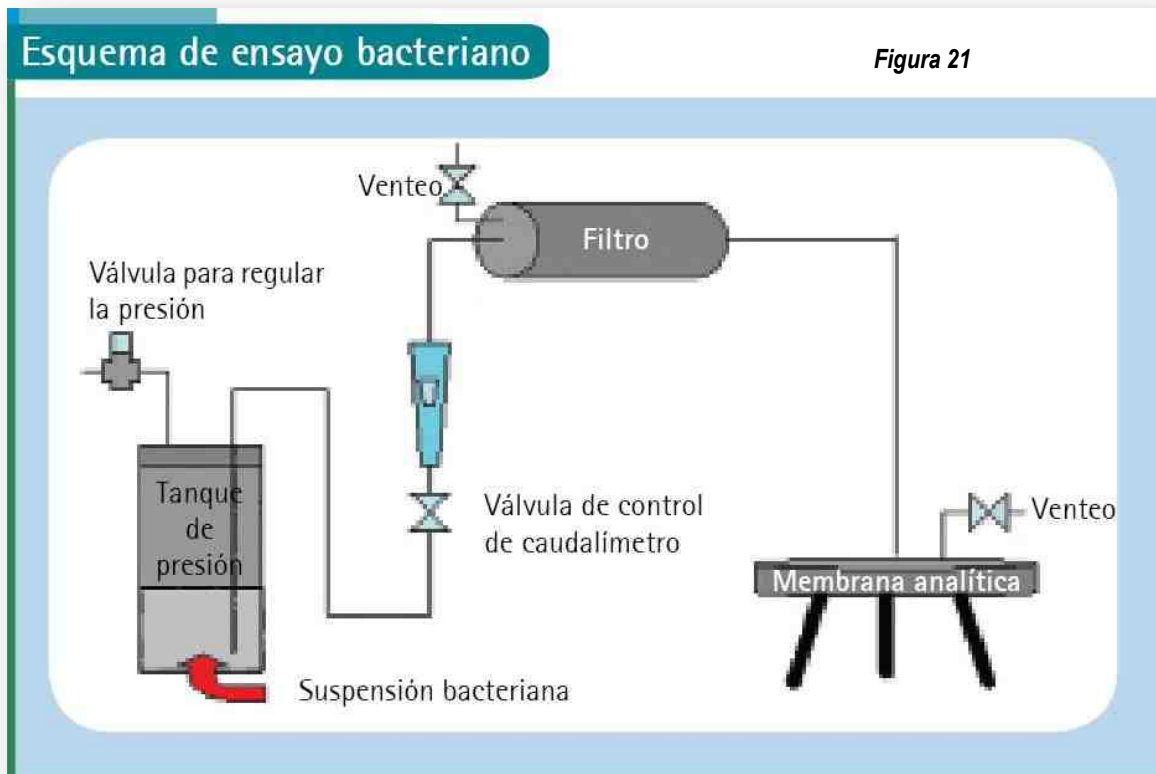
Figuras 18 y 19

Método de Forward Flow o flujo anticipado

Figura 20



Cuando se usan cartuchos de 30" (760 mm) cuya superficie es de 25 pies² (2.2 m²) el caudal de flujo difusivo llega a valores de 36 cc/min. Esto hace que el caudal de aire sea muy alto aún a presiones de 10 psi confundiendo con el punto de burbuja. De ahí la importancia del desarrollo ideado por el Dr Pall. Si el ensayo fuera manual lo más previsible sería que el operador, en la suposición que el cartucho esté dañado, lo descarte.



Deberá descartarse el ensayo de punto de burbuja como único ensayo cuando se trate de certificar filtros de alta superficie de membrana. Pero hay que considerar que para definir la eficiencia de los mismos debemos estudiar las peores condiciones posibles. Para ello se consideró ensayarlos con concentraciones de *B.diminuta* con efluente cero (Figura 21). Ya en 1977 Reti de Millipore (6) había relacionado el punto de burbuja de diferentes membranas con el porcentaje de retención bacteriana, viendo que a mayor punto de burbuja medido en psi, mayor la reducción de concentración de bacterias. El fabricante de la membrana ha definido mediante ensayos adecuados cuál es el punto de burbuja máximo por arriba del cual sus membranas no tienen penetración de bacterias. Definen por este método los valores de punto de burbuja que corresponden a 0.1, 0.2, 0.45 micrones para cada tipo de membrana y para los diferentes fluidos de ensayo: agua, alcohol isopropílico, etc.

En el caso del flujo difusivo se define el flujo máximo, por debajo del cual no se registra penetración de bacterias, con ensayos destructivos.

Ensayo de flujo difusivo. Su metodología práctica

En el trabajo de desarrollo del método, se midió el caudal de aire que pasaba por difusión a través de los elementos, y posteriormente se efectuó el ensayo destructivo con bacterias, determinándose la esterilidad o no del efluente. Se hacen las tablas o gráficos correspondientes viéndose el caudal de flujo difusivo por debajo del cual no hay penetración de bacterias. Se aplica un coeficiente de seguridad y se define el caudal máximo admisible por arriba del cual debe descartarse el elemento filtrante (disco o cartucho de membrana). La ventaja fundamental de este método con respecto al punto de burbuja es que en éste los valores son medibles con instrumentos adecuados.

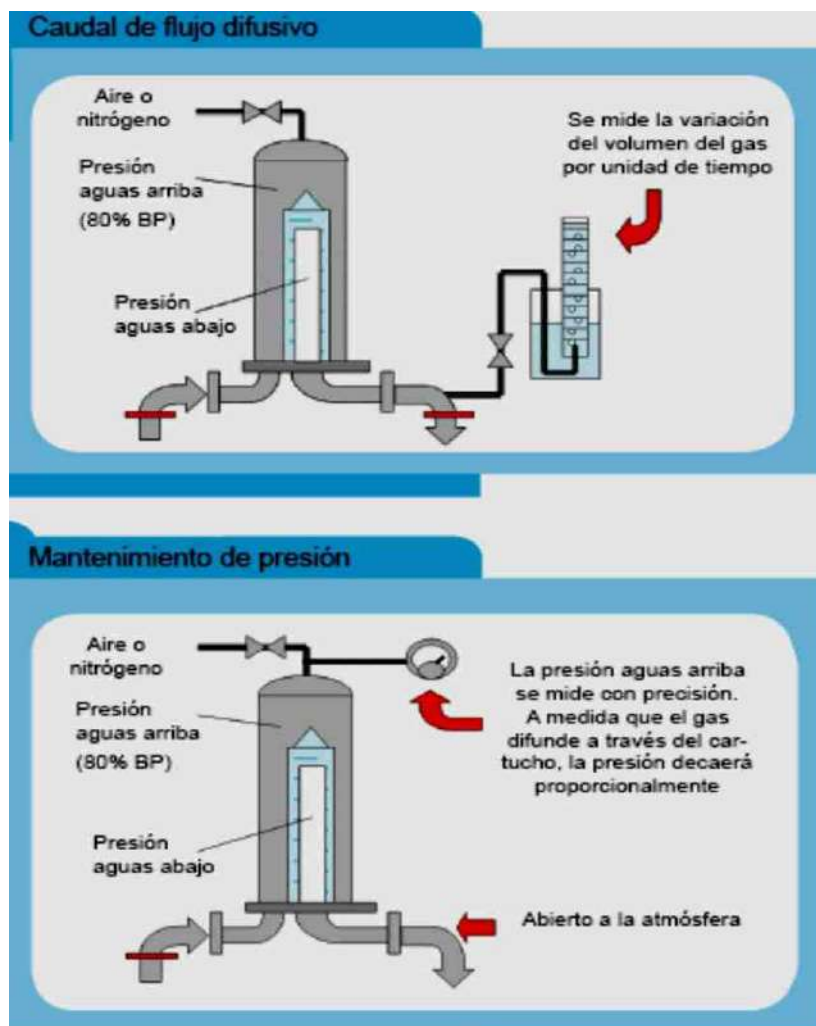
Debe hacerse notar que este método es aplicable a membranas con tamaños de poro pequeños, en las que la dispersión por tamaños es bien conocida reproduciéndose sus características

Los valores de caudal de aire en función de la presión se toman normalmente a presiones de entre un 80% al 90% del punto de burbuja (Figura 22). En la figura se ve como el caudal de flujo difusivo varía linealmente con la presión, hasta llegar al punto de burbuja, donde al abrirse los poros de mayor tamaño el flujo difusivo bruscamente aumenta.

Figura 22



Figuras 23 y 24



Para evitar equívocos es importante atenerse a los valores dados por cada proveedor para cada elemento, no siendo extrapolables los valores entre membranas de diferentes fabricantes. En cuanto al ensayo en sí, puede efectuarse de dos formas diferentes: por medición del caudal de aire o por la velocidad de variación de la presión del aire contenido dentro de la carcasa una vez llevado a determinado valor y cerrada la válvula de entrada.

En el primer método se inyecta aire a una determinada presión, a la carcasa con el filtro ya mojado instalado, y el aire que lo atraviesa se mide en la bureta graduada como se puede ver en el dibujo de la Figura 23, por el desplazamiento del agua que contiene. Dividiendo el volumen de aire por el tiempo transcurrido se obtiene el caudal difusivo.

En la Figura 24 puede verse el dispositivo usado para la determinación de la integridad de un filtro por la variación de la presión dentro de la carcasa. Una vez colocado el cartucho a ensayar totalmente mojado se inyecta aire a una presión determinada mediante el regulador y el manómetro. Luego se corta la entrada de aire mediante la llave intermedia y se lee la presión en el manómetro de la derecha, después de un cierto tiempo. La diferencia entre ambas presiones, en el tiempo estipulado, está relacionada con el caudal de flujo difusivo, no pudiendo exceder el valor tabulado para el filtro y carcasa utilizados. Es evidente que cuanto mayor la velocidad de disminución de presión, mayor el flujo difusivo que la ocasiona.

Instrumentos automatizados para realizar pruebas de integridad

Para realizar el punto de burbuja, todos los instrumentos operan bajo el mismo principio. Poseen un regulador de presión y un transductor de presión (aparato electrónico que mide presión) y operan del mismo modo que haciendo la prueba manualmente: van incrementando la presión de a “pasos” y miden la caída de presión en un breve período de tiempo. A través de un algoritmo matemático sobre esta caída de presión el instrumento toma la decisión sobre si ese punto de presión es el punto de burbuja.

La Figura 25 tiene el propósito de clarificar conceptos.

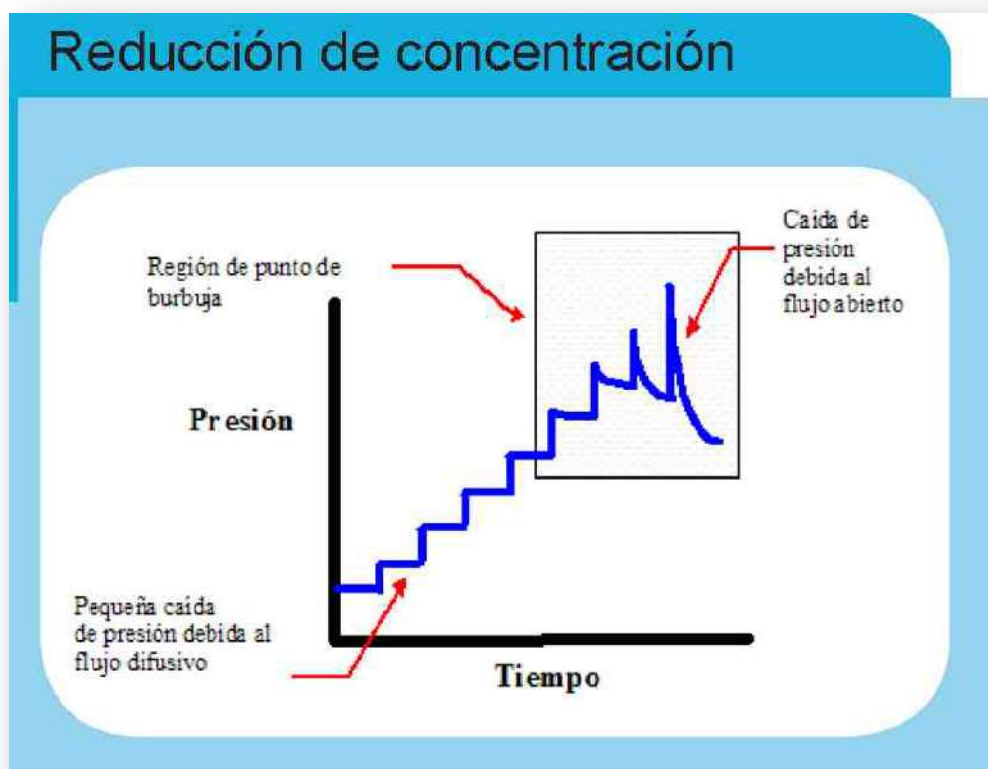


Figura 25

Según el incremento de presión que se le da a estos “pasos” y el algoritmo matemático usado para medir la caída de presión, tendremos mayor o menor precisión en la medida, y también requerirá de más o menos tiempo

para realizarla.

Para efectuar la medida de flujo difusivo, en cambio, los instrumentos tienen diferencias de principios, que permiten clasificarlos en: • Instrumentos que solo miden presión • Instrumentos que miden Caudal/ masa.

Los instrumentos que sólo miden presión realizan una medida indirecta del caudal. Alcanzan la presión dada por el fabricante del filtro para la prueba, cierran el sistema por medio de una válvula y miden la caída de presión en el tiempo. Con este dato y basados en la ley general de los gases, a la caída de presión la transforman en volumen. Con este dato de volumen y con el tiempo medido calculan el caudal y lo comparan con el valor dado por el fabricante del filtro.

Los instrumentos que miden Caudal/masa, realizan una medida directa del caudal. Poseen al menos un transductor de presión para medir la presión en el lado sucio del filtro, de manera de mantenerla constante en el tiempo, incrementando o disminuyendo el caudal del gas en el sistema.

Estos instrumentos que miden caudal/masa frecuentemente requieren de menor tiempo para realizar la medición en virtud de un algoritmo matemático que hace que corte las mediciones dando un resultado de “Pasa la prueba” o “No pasa la prueba” (Figura 26).

El fabricante deberá proveer al usuario la información sobre los valores máximos admisibles para la disminución de la presión en el interior del filtro en el tiempo predeterminado para cada tipo de filtro de membrana, y para cada fluido de ensayo.

La ventaja de este método con respecto al de flujo difusivo es que no se pierde la esterilidad de la conexión.

Aspectos a tener en cuenta:

En estos tiempos, fines del año 2010, cuando se escribe sobre instrumental específico para realizar pruebas de integridad, debe tocarse los siguientes aspectos:

1. Consideraciones para áreas limpias: La generación de partículas por estos instrumentos debe minimizarse cuando se utilizan en áreas limpias.

Debido a que los artefactos electrónicos para operar correctamente deben trabajar en un rango de temperaturas, los instrumentos para medir integridad de filtros deben “refrigerar” de algún modo su sistema y en estos casos es mejor que se usen disipadores en lugar de ventiladores, pues estos últimos pueden influir en la medición de partículas en el área.

De tener que imprimirse un resultado, es conveniente que tengan impresoras de papel térmico (no producen impacto sobre el papel) en lugar de matriz de puntos u otras que pudiesen generar “pelusas” de papel por el impacto ocasionado.

La protección contra la contaminación no es un tema menor en esta clase de instrumentos. Algunos instrumentos poseen válvulas de venteo externas para este fin, otros poseen sistema “limpiables”, otros trampas de agua y sólo algunos combinan estos sistema de protección.

2. Código de barras: La nueva generación de filtros poseen códigos de barras para evitar errores, con lo cual es necesario que los instrumentos sean capaces de leerlos. El instrumento una vez leído el código debiera seleccionar un programa predefinido de prueba de integridad, disminuyendo riesgos del operador en carga de datos o selección de programas.

3. Protección contra salpicaduras: Las distintas clases de protección fijan, en qué medida se puede exponer un aparato eléctrico en condiciones ambientales adversas, sin ser dañado o sin representar un riesgo de seguridad



o para la salud.

Los grados IP (Ingress protection /Protección contra ingreso) respecto a los agentes ambientales y humanos, externos a los dispositivos eléctricos se denominan mediante la codificación IP XX (XX son dos números).

Si un instrumento tiene grado IP54 está protegido contra polvo e inyecciones de agua proyectadas desde todas direcciones.

En esencia no queremos que el instrumento ante una simple salpicadura o al "limpiarlo" adecuadamente nos deje de funcionar.

4. *21 CFR part 11*: Esta regla tiene por objetivo establecer requisitos para la grabación de datos electrónicos y el uso de firmas electrónicas. En esta norma se establece que el riesgo de la falsificación, interpretación equivocada o cambios sin dejar evidencias son más altos con los registros electrónicos y firmas electrónicas que cuando se hacía en papel y firmas autógrafas. Por lo tanto para minimizar estos riesgos se requieren controles específicos como son:

- **Seguridad de acceso:** los sistemas deben limitar el acceso al personal calificado y autorizado
- **Firmas electrónicas:** los resultados de las pruebas son firmadas electrónicamente por el operador (PIN y password). Los sistemas deben establecer medidas que aseguren que el uso de estas firmas esté limitado a los dueños genuinos.

Puntos destacados que deberían incluirse en los instrumentos para ser conformes con esta norma:

- **Expiración de password:** la expiración de un password dado e un tiempo determinado
- **Mínima longitud del password:** setear a un mínimo de 4, 6 u 8 caracteres
- **Bloqueo del sistema:** Cuando las combinaciones de usuario/password sean falsas debe bloquearse el sistema y ser reabierto sólo por el administrador.

Bibliografía

1. S. Jacobs. "*The Distribution of pore diameters in graded ultrafine membranes*", Filtration & Separation September/October 1972, page 525
2. D.P. Pall and E.A. Kimbauer. "*Bacterial Removal Prediction on Membrane Filters*". 52nd Colloid & Surface Science Symposium of Tennessee, June 12 (1978) Pall Corp. Publ. STR #PUF13
3. Masako Osumi, Naoko Yamada and Mida Toya. "*Bacterial Retention mechanisms of Membrane Filters*", PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Volume 50. Enero/Febrero 1996
4. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. FDA (1987).
5. David B. Pall. "*Quality Control of Absolute bacteria Removal Filters*". Bull of Parenteral Drug Assoc. 1975 page 192-204
6. A.R. Reti de Millipore Corp. "*An assessment of test criteria in evaluating the performance and integrity of sterilizing filters*". Bull Parenteral Drug Association 31(4): 187-194. (1977)

Bibliografía adicional:

G.Howard y R.Duberstein. "*A case of penetration of 0,2 micron rated membrane filters by bacteria*". Journal of the Parenteral Drug Association. 1980, page 95

Indicadores biológicos de esterilización

Russ Nyberg

Traducido desde el original por: Sergio Iglesias y Mónica Lagomarsino.

- *El uso de Indicadores Biológicos (IB) en cargas de productos*
- *Uso de dispositivos para el desafío de los procesos, o Process Challenge Device (PCD)*
- *Uso de IB no tradicionales o especiales.*
- *Esterilización de desechos provenientes de un laboratorio de Microbiología.*
- *IB de lectura rápida*
- *Calificación de la Performance de los IB.*
- *Uso del BIER Vessel*
- *Medios de recuperación*
- *Utensilios de laboratorio / Personal y Técnica*
- *Bibliografía*

Uso de Indicadores Biológicos en cargas de productos inyectables.

Al momento se han utilizado diferentes modelos y presentaciones de Indicadores Biológicos (IB) durante la validación y el monitoreo de los ciclos de esterilización por vapor de numerosos productos farmacéuticos, incluyendo ampollas con líquidos. Los IBs que han sido usados incluyen suspensiones de esporas cuantificadas, y tiras conteniendo esporas que han sido inoculadas directamente dentro del producto, o indicadores autocontenidos. Además se han utilizado IB para monitorear cargas de líquidos colocando tiras con esporas o indicadores auto-contenidos en varios puntos dentro de la cámara del autoclave.

En el año 2001 se observó un evidente incremento en el uso de suspensiones de esporas y de indicadores autocontenidos en desmedro de las tiras con esporas, y en especial cuando se usaban indicadores biológicos para monitorear cargas líquidas esterilizadas por vapor, quizás con el fin de reducir el número de falsos positivos debidos a la contaminación por el manipuleo posterior a la esterilización, pero también porque éstos requieren menores períodos de incubación, previo a la liberación del producto. La contaminación posterior a la esterilización se reduce drásticamente con el uso de los IB autocontenidos; esto es especialmente cierto si el IB es del tipo de ampolla de vidrio sellada. Sin embargo, quizás lo más importante es que con estos indicadores pueden obtenerse resultados mucho más precisos y útiles cuando se utilizan en ciclos con cargas líquidas.

Las situaciones siguientes ayudarán a ilustrar las situaciones problemáticas que pueden ocurrir cuando los IB se usan de manera incorrecta sin tener en cuenta los cambios que pueden ocurrir en la resistencia de las esporas.

Cuando una suspensión cuantificada de esporas se utiliza para validar un ciclo de carga líquida, se puede añadir dicha suspensión directamente al producto que va a ser esterilizado o en contenedores que simulan el producto, y además se colocan en diversos lugares de la cámara. En el caso que se agregue la suspensión directamente en el producto, se prueba el efecto de dicho producto sobre las esporas, ya que este ensayo puede proporcionar información importante acerca de la resistencia de las esporas cuando están en contacto con el producto que va

a ser esterilizado.

En la mayoría de los casos la resistencia provista en el certificado de una suspensión de esporas determinará el Valor D; o proveerá la resistencia de las esporas sobre la tira de papel; o datos sobre la resistencia si los indicadores se utilizan en un volumen especificado de Agua Deionizada. La resistencia declarada de las esporas en la suspensión bajo estas condiciones, probablemente será muy diferente a la obtenida si las esporas se colocaran en el producto real que va a ser esterilizado. Tanto el producto como el envase que lo contiene pueden afectar la resistencia de las esporas a la esterilización. El volumen de producto, su composición, su viscosidad y el material del envase influirán en la resistencia de las esporas. Esto no quiere decir que la resistencia de las esporas cambie, sino que todos estos factores influyen en la velocidad de transferencia térmica o de calor, aumentando o disminuyendo el tiempo necesario para producir la letalidad de las esporas. Así, la resistencia de las esporas puede ser diferente “bajo estas nuevas condiciones”.

Con el fin de ilustrar el efecto del producto y de su envase sobre la resistencia de las esporas, se han inoculado varios productos similares con esporas procedentes del mismo cultivo de *G. stearothermophilus*. Estas esporas se utilizaron también para inocular tiras de papel a modo de referencia. Se determinó la resistencia de las esporas en las tiras a 121 °C, siendo el valor D obtenido de aproximadamente 1,0 minuto. Los productos en análisis estaban envasados o en vidrio o en polipropileno. La viscosidad de los productos seleccionados y sus volúmenes de llenado eran diferentes entre sí. Cada uno de los diez productos ensayados se inoculó con la misma población de esporas, obteniéndose así 10 diferentes valores D a 121 °C. Estos valores D fueron calculados para cada producto utilizando el Método de Curva de Supervivencia. La Tabla 1 proporciona los resultados obtenidos de valor D.

Producto ensayado	Material de envase	Volumen de llenado	Valor D a 121°C
#1	Polipropileno	40 ml	3.2 minutos
#2	Polipropileno	50 ml	4.5 minutos
#3	Polipropileno	50 ml	1.6 minutos
#4	Polipropileno	50 ml	1.9 minutos
#5	Polipropileno	50 ml	4.0 minutos
#6	Vidrio	50 ml	3.0 minutos
#7	Vidrio	50 ml	4.4 minutos
#8	Vidrio	50 ml	8.0 minutos
Agua para Inyectables	Vidrio	100 ml	3.3 minutos
Agua deionizada	Vidrio	100 ml	2.7 minutos

Table 1. Valor D
Esta información ha sido previamente publicada en Journal of Validation Technology⁽¹⁾

Para los siete productos ensayados con un volumen de 50 ml, los valores de D variaron entre 1,6 y 8,0 minutos. A menos que las pruebas de resistencia se lleven a cabo dentro del producto, no podría conocerse la resistencia real de un ciclo. Por lo tanto, el valor de resistencia que figura en el certificado no se debería utilizar a manera de BI “calibrado” para usar con el producto, ya que dicho valor indicado de resistencia tiene poco valor, excepto que sea utilizado para comparar tendencias. Tal validación no proporciona documentación de la resistencia del IB en el producto que se va a esterilizar, a menos que se realice un estudio similar al ilustrado anteriormente. El valor D puede no aumentar como se esperaba, creando así un desafío mayor. En algunos casos, la resistencia puede caer por debajo de lo que podría considerarse un desafío mínimo. Es necesaria la existencia de estos datos para demostrar que las esporas usadas fueron un desafío significativo para el producto ensayado. El conocimiento de

estos datos puede proporcionar información importante acerca del ciclo y que puede ser utilizada para determinar la letalidad y el F_0 acumulado (F_0 es una medida de la capacidad de inactivación microbiana de un proceso de esterilización).

Uso de un *Process Challenge Device* (PCD)

Una vez que se conoce la resistencia de las esporas, o que se haya desafiado su resistencia en el producto, se puede utilizar un dispositivo que evalúe por medio de IB o indicadores químicos la efectividad de la penetración del esterilizante en un proceso de esterilización. Dicho dispositivo (PCD o *process challenge device*) debe ofrecer mayor o igual resistencia que el producto real a esterilizar, aunque no tiene por qué parecerse al producto, sino que debe simular la "resistencia" a la esterilización. Si un laboratorio ha determinado y comprobado que su producto inoculado tiene un valor D a 121 °C de 1.8 minutos, se puede elegir un IB que tenga un valor D de 1.9 minutos o mayor de resistencia con el PCD, para evitar la inoculación directa del producto. Esto tiene una gran ventaja respecto del riesgo relacionado con la inoculación directa del producto.

Si se elaboran viales de 4 ml de un producto líquido, se puede enviar una adecuada cantidad de la solución y unidades usadas en el empaque primario (viales, tapones y precintos) a un laboratorio que cuente con un BIER Vessel (*Biological Indicator Evaluator Resistometer*) para determinar el valor D de las esporas en el producto (ver más adelante). Previo a la determinación de valor D, es conveniente que el laboratorio efectúe un estudio de inhibición del producto inyectable y la determinación de la recuperación de esporas utilizando un método validado. Para ello los viales de producto son inoculados con una cantidad conocida de esporas de *G. stearothermophilus* (si el proceso de esterilización es por vapor), por lo general 6 logs, y luego se exponen a varios ciclos de esterilización en el BIER Vessel, y se determina la Fracción negativa del Valor D. Ahora que se conoce el valor D del producto real, **no es necesario efectuar la inoculación directa en el producto**. Un CPD adecuado puede ser utilizado en los ciclos futuros, y gran parte del trabajo de laboratorio relacionado con la inoculación del producto puede ser eliminado.

El uso de esporas en tiras de papel para monitorear o validar los ciclos con cargas de líquidos, puede proporcionar información acerca de la cámara pero no controla lo que está ocurriendo realmente dentro de la carga líquida. Colocando las tiras de papel de esporas en diversos lugares en la cámara o colgando las tiras con cinta adhesiva en el interior de los contenedores sólo se monitorean las condiciones de la cámara. La cámara puede permanecer a 121 °C durante quince minutos o más antes de que el líquido alcance los 121 °C. Un ciclo de 15 minutos a 121 °C puede matar las esporas de las tiras colocadas en la cámara, pero sin embargo el líquido pudo haber sólo alcanzado los 121 °C durante 1, 2 ó 5 minutos, o ni siquiera haber alcanzado dicha temperatura. Las esporas en las tiras pueden haber muerto, pero sin embargo la carga no estará estéril. La carga pudo incluso no haber llegado a 100 °C en esos 15 minutos. Colocar las tiras de esporas dentro del líquido a esterilizar es también inapropiado. Este sería un ejemplo del uso "no previsto" de tiras con esporas, ya que la prueba de resistencia proporcionada con la mayoría de las tiras de papel se determina en tiras secas con un BIER Vessel en una condición de buena calidad del vapor, lo cual no puede ser comparado con la resistencia obtenida sumergiendo las tiras en un líquido. Se entiende que una pobre calidad de vapor o "vapor húmedo" creará condiciones diferentes dentro de la cámara. El vapor húmedo altera la resistencia de los IB por disminución de la eficacia de la transferencia de calor y por tanto alarga el tiempo de exposición necesario para matar las esporas contenidas en los IB.

Si se está controlando o validando los ciclos con carga de líquidos, debe utilizarse un indicador biológico diseñado para dichas cargas líquidas. En la Figura 1 se muestran varios IB en ampollas de vidrio selladas disponibles de distintos proveedores. Los IB en ampollas de vidrio están diseñados para ser introducidos en el líquido que va a ser esterilizado. En la Figura 2 se muestra la colocación de ampollas dentro de varios recipientes con distintos volúmenes ⁽²⁾. Esto es lo que se debe probar, no la cámara sino el líquido real. Los fabricantes de indicadores biológicos proporcionan IB en la forma de ampollas de vidrio en una amplia gama de tamaños y volúmenes de entre 1 ml y 4 ml por vial o aún mayor. Estos IB suelen contener, por ampolla, un número cuantificado de esporas bacterianas, una cantidad de medio de cultivo líquido y un indicador de pH para que sea más fácil la observación del crecimiento dentro de la ampolla debido a un cambio de color.

La resistencia de los indicadores en ampollas está determinada por la ampolla de vidrio sellada como una unidad. Cuando se la coloca en un líquido que va a ser esterilizado, independientemente del tipo de líquido o de su viscosidad, la ampolla aún mantiene la misma resistencia que la que indica el certificado; esto se debe a que

la ampolla está sellada. Sin embargo el volumen del líquido, su viscosidad, la posición de la ampolla dentro del recipiente y el envasado afectarán la velocidad de transferencia de calor. La ampolla nunca debe estar en contacto directo con vapor de agua, no es el vapor el causante de la letalidad, sino que el vapor actúa como transportador de energía, o transfiere el calor que causa la letalidad desde el vapor al líquido, luego al vidrio de la ampolla, luego al líquido que está dentro de la ampolla y finalmente a las esporas en suspensión.



Figura 1. Varios IB en ampollas de vidrio



Figura 2. Ampollas colocadas en el seno de líquidos.

Como un ejemplo de la importancia de la colocación apropiada de los IB dentro de un líquido que va a ser esterilizado, la Figura 3 muestra un gráfico de la temperatura de varias zonas de un recipiente de un volumen de 2 litros que se esterilizó a 121.1 °C.



Figura 3. Lectura de las termocuplas

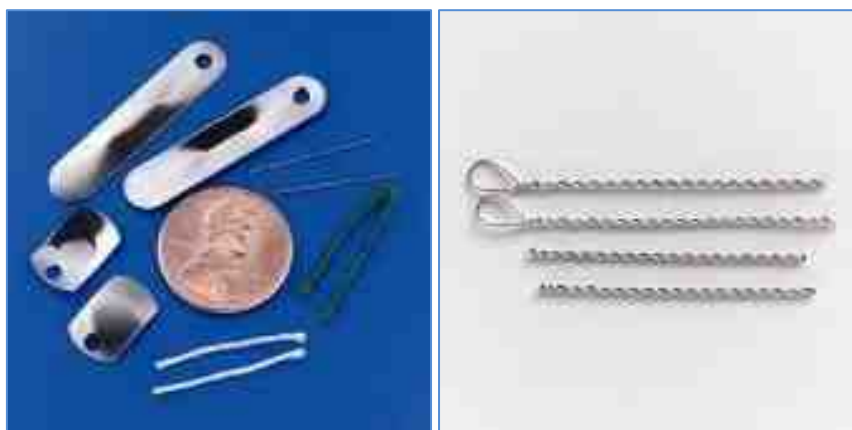
En este gráfico se representan 5 termocuplas (TC) que fueron utilizadas para registrar las temperaturas del líquido y la cámara durante el ciclo de esterilización. La línea # 1 representa la temperatura del líquido en la zona superior del Erlenmeyer. La línea # 2 es la TC posicionada ligeramente más abajo, hasta llegar a la línea # 4 que representa la TC posicionada en el área más inferior del recipiente. La línea # 5 grafica la TC en la cámara del autoclave. La línea # 1 indica que la zona superior del líquido alcanzó los 121,1 °C aproximadamente a las 14:18:40, 14 minutos después que la cámara llegó a dicha temperatura. Si este ciclo hubiese estado seteado para un tiempo de esterilización de 15 minutos, el área superior del líquido hubiese estado a una temperatura de 121 °C durante aproximadamente 1 minuto, en cambio la TC # 4 no alcanzó esa temperatura hasta aproximadamente 14:28:20, o sea 10 minutos después que la TC#1. Una ampolla situada cerca de la superficie del líquido o flotando en él, puede indicar esterilización demostrando “no crecimiento”, pero no una ampolla colocada en el fondo.

La velocidad o el tiempo necesario para la transferencia de calor de manera que el líquido alcance una temperatura de 121 °C condicionan el tiempo de exposición necesario para producir la letalidad en un ensayo de desafío biológico. Si la ampolla tiene una resistencia de 2,0 minutos a 121 °C, la resistencia de las esporas no va a cambiar cuando se la sumerge dentro del líquido. La resistencia de las esporas en la ampolla se mantendrá en 2,0 minutos a 121 °C. Una vez que el ciclo ha comenzado, el tiempo necesario para que el producto alcance los 121 °C sin duda variará dependiendo de la configuración del recipiente que lo contiene. Sin embargo, si las esporas del IB son destruidas durante el ciclo y el IB fue correctamente colocado, aún restan 2.0 minutos a 121 °C para la muerte de las esporas del IB. La importancia de esto es que la exposición necesaria determinada para producir letalidad ahora se puede utilizar para documentar que una población certificada con un valor D conocido desafiada fue destruida en ese ciclo en la zona más difícil de esterilizar. En esta situación, el factor de resistencia es conocido y la reducción logarítmica puede ser determinada y documentada. Este factor conocido de resistencia es muy importante y forma parte del desarrollo y la validación de un ciclo de esterilización. Esta información puede utilizarse para el seguimiento de los futuros ciclos con carga de líquidos.

Mientras que las esporas soportadas en tiras siguen siendo el tipo más utilizado de IB para el monitoreo de los ciclos de esterilización por vapor, en las cargas de líquidos los IB auto-contenidos sellados y las suspensiones de esporas proporcionan información precisa sobre el nivel de aseguramiento de la esterilidad de los líquidos esterilizados.

Uso no tradicional o uso especial de los IB.

Existe una amplia variedad de materiales de soporte o *carriers* en uso hoy en día. Dependiendo del método de esterilización y el elemento a esterilizar. Se puede optar por diferentes materiales de soporte, incluyendo alambres de acero inoxidable, hilos de algodón, discos de fibra de vidrio, mini tiras de papel, tiras y discos de metal, así como soportes de plástico. Si una tira de esporas de papel es demasiado grande en tamaño para ser colocados dentro de un material a ser controlado, están disponibles pequeños *carriers* tal como se muestra en las Figuras 4 y 5.



Figuras 4 y 5. Fotos cortesía de Raven Labs, una división de Mesa Labs⁽³⁾

Esos IBs tan delgados o pequeños están calibrados al igual que las tiras de papel, y el Certificado de *Performance* proporciona información sobre el valor D, la población y el tiempo de Sobrevida / Muerte de acuerdo con la Farmacopea de Estados Unidos (USP). Con ayuda de instrumentos con diámetros muy pequeños los ingenieros de Validación están tratando de utilizar para la verificación de la esterilización, IB nuevos y más delgados o más pequeños cuando es necesario. La selección de un IB adecuado para un determinado método de esterilización es de suma importancia. Ya no es aceptable usar una tira de esporas en un lugar determinado, sólo porque no hay IB más pequeños. Muchas de estas configuraciones especiales de IB para uso industrial están disponibles para VHP (Vapor de Peróxido de Hidrógeno), para vapor y para calor seco con el microorganismo de prueba adecuado, ya sea *G. stearothermophilus* o *B. atrophaeus*.

Esterilización de residuos del Laboratorio de Microbiología

Aproximadamente el 75 a 80% de todas las instalaciones de tratamientos de residuos externos de los laboratorios de Microbiología utilizan la esterilización por vapor como método de tratamiento de residuos. La esterilización por vapor también es comúnmente utilizada en los laboratorios ubicados en la industria farmacéutica para tratar sus residuos. Muchas de esas instalaciones son monitoreadas periódicamente con IBs para determinar la eficacia del proceso de esterilización, tal como lo requieren las agencias regulatorias. Los IBs más comúnmente utilizados para el monitoreo de los ciclos por vapor son las tiras, o los indicadores auto-contenidos en pequeños contenedores de plástico rompibles.

Para controlar los ciclos de esterilización, se pueden colocar tiras con esporas directamente en la bolsa de desechos antes de la esterilización. Luego de finalizado el ciclo las tiras de esporas se remueven y se transfieren asépticamente a un tubo conteniendo medio de cultivo. Luego el medio se incuba para determinar si hay o no crecimiento. La transferencia de las tiras al medio de cultivo se puede realizar en el sitio, o puede enviarse a un laboratorio tercerista. Los resultados de las pruebas deben ser documentados y los registros deben mantenerse como evidencia de que el control de la esterilización se ha efectuado.



Figura 6. Tiras con esporas tubos con medio de cultivo.

Gran parte de los residuos microbiológicos en un ciclo de esterilización de residuos puede consistir en placas de Petri con medio agarizado, tubos inclinados o *slants*, medios de cultivos de deshecho y placas que han sido utilizadas para valoraciones microbiológicas, junto a otros elementos que pueden fundirse o derretirse provocando fugas de su contenido líquido en la bolsa de residuos durante su esterilización. Estos líquidos a menudo penetran en el envase del indicador o sobre el envase plástico del indicador auto-contenido. Esa situación puede complicar retirar los indicadores del interior de la bolsa.

Si el agar líquido fundido entra en contacto con las tiras que contienen esporas, la *performance* real del indicador puede verse comprometida, ya que las tiras no están diseñadas para ser usadas en ciclos similares a las cargas líquidas. Los pequeños indicadores auto-contenidos también pueden revestirse con los desechos líquidos, también comprometiendo la eficacia del indicador.

Una vez más, para este uso es necesario un tipo de IB adecuado: los Indicadores en ampollas de vidrio que han sido diseñados específicamente para ciclos donde los líquidos están presentes. Simplemente se inserta la

ampolla dentro de la bolsa y se ejecuta el ciclo de esterilización. Al completar el ciclo la ampolla se retira de la bolsa *BioBag* y se coloca directamente en la incubadora. ¡Esterilizar e incubar!. Otros pasos no son necesarios. El medio de cultivo contenido en la ampolla contiene un indicador de pH para que, durante la incubación, si hay desarrollo de bacterias se detecta cambio de color púrpura brillante a un color amarillo brillante. Si el ciclo de esterilización se ha realizado correctamente, la ampolla se mantiene de color púrpura. El tiempo de incubación necesario para la mayoría de estos tipos de ampollas es de 48 horas. La porción superior de la ampolla tiene un cuello en que se puede colocar una cadena larga o un alambre para colgar la ampolla y así colocarla dentro de la bolsa *BioBag* con la cadena colgando fuera de la bolsa. Cuando el ciclo ha terminado, la ampolla se recupera tirando de la cuerda. La ampolla luego se limpia y se coloca directamente en la incubadora.

Sin importar el área o material se necesita probar la penetración del esterilizante, y para asegurar la esterilidad, es probable que exista un tipo de IB adecuado para satisfacer sus necesidades. No se conforme y no utilice un IB que en realidad no es apropiado para tal uso, Póngase en contacto con el fabricante de IB y hágale saber cuál es su necesidad y pida asesoramiento para que el IB se ajuste a sus requerimientos.



Figura 7. Un IB en ampolla de vidrio está siendo removido de la bolsa de desechos luego de la esterilización.

Indicadores de lectura rápida

Debido a la importancia en la obtención de resultados con mayor rapidez, se desarrollaron indicadores biológicos de lectura rápida. Para los indicadores de esporas en tiras, el período de incubación es de 7 días hasta la obtención del resultado final “crece / no crece”. Luego se desarrolló un IB auto-contenido, y algunos indicadores de esporas en tiras que reducen el período de incubación a 48 o hasta 24 horas. Pero los usuarios requieren aún mayor rapidez para liberar sus productos o materiales que han sido esterilizados.

La tecnología usada para los IB de lectura rápida se basa en detectar la respuesta de enzimas específicas. Este tipo de IB utiliza un sistema de detección fluorimétrica, donde la enzima ligada a la espora puede ser detectada por medio de una incubación y lector especial dentro de 1 a 3 horas luego del proceso de esterilización, para obtener el resultado si el ciclo pasó o falló. Para el proceso de esterilización con óxido de etileno el resultado puede obtenerse a las 4 horas. Esto ofrece una alternativa para la liberación rápida, sin esperar las 24 o más horas de incubación. Algunos usuarios de estos IB rápidos periódicamente continúan efectuando el control con IB incubados en medios tradicionales en los que el cambio de pH que resulta en cambio de color, demuestra el crecimiento o no de las esporas. Los fabricantes de los IB pueden ofrecer datos confiables sobre esta nueva tecnología.

Para uso en la industria o en clínica, también pueden obtenerse *Test packs* conteniendo integradores químicos de clase 5 e IBs de lectura a las 24 hs. Las normas AAMI permiten que las cargas de productos que no son implantes de uso clínico, o las cargas industriales puedan ser liberadas o tratadas de inmediato basándose en el resultado de integradores de Clase 5. Los paquetes además contienen un IB auto-contenido que se incuba de

manera tradicional para obtener el resultado a las 24 hs. Como se ve en las Figuras 8 y 9, los Test Pack tienen un tamaño similar a los utilizados para detectar remoción de aire (Ensayo de Bowie/Dick).

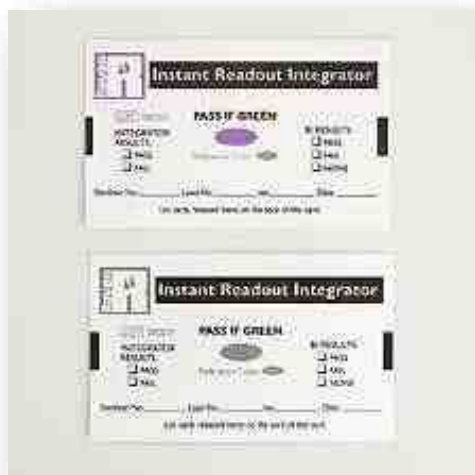


Figura 8. Integrador químico Clase 5 de resultado inmediato. Si la esterilización es aceptable el color cambia de rosa a verde.

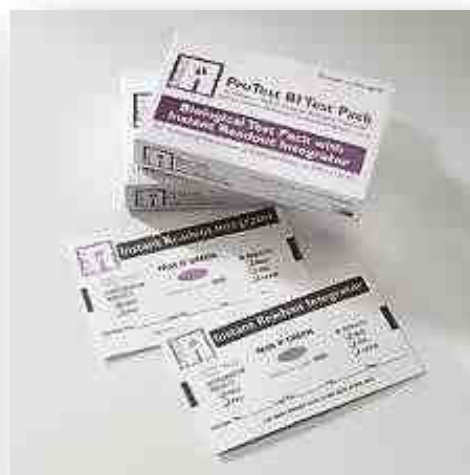


Figure 9. Envases con cartas con integradores químicos

Calificación del desempeño de los Indicadores Biológicos

Con respecto al rendimiento de los IB y sus características, la mayoría de los usuarios de las industrias farmacéuticas los califican a su ingreso, estableciendo criterios de aceptación antes de usarlos para validar o monitorear algún ciclo. El criterio de aceptación por lo general sigue los lineamientos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) para la resistencia biológica y la población microbiana. Durante el proceso de verificación para la aceptación para su uso pueden surgir dificultades respecto de cómo estos IB deben ser controlados.

Como parte de esta verificación se espera que el lote de IB que se va a ensayar cumpla con los requisitos específicos establecidos en la norma ISO o la USP en cuanto a la exactitud la resistencia o valor D, y la Población declarados por el fabricante en el certificado del lote. Por ejemplo, para que la prueba de resistencia cumpla con la USP <55> Official Monograph Biological Indicator, *Resistance Performance Tests*: “La prueba cumple con los requerimientos si el valor D determinado está dentro del 20% del valor D informado por el fabricante a la temperatura de esterilización seleccionada, y si los límites de confianza están dentro del 10% del valor D determinado” ⁽⁴⁾. Una vez que la resistencia o el valor D se ha verificado y está dentro de los límites aceptables, y cumple o excede los criterios mínimos de aceptación para la resistencia del IB de acuerdo a la norma ISO o la USP, el lote de IB puede ser utilizado para trabajos de validación. Como ejemplo, una resistencia mínima a 121 °C para la mayoría de los ciclos de esterilización con vapor tendría un valor D de 1,5 minutos o más, y se considera un desafío aceptable para el proceso de esterilización.

Uso del BIER Vessel

Con el fin de verificar el valor D declarado por el fabricante, la USP <55> *Resistance Performance Tests*, y la norma ISO series 11138, permiten el uso de uno de los tres siguientes métodos: Se puede utilizar el método del Número Más Probable por recuento directo, o un método de Fracción Negativa (tal como *Spearman / Karber*)⁽⁴⁾, o evaluar la exactitud del valor D mediante el uso del cálculo de Tiempos de Sobrevida/Muerte según USP. Independientemente de cuál de los tres métodos se utiliza, será necesario contar con un Resistómetro. El Resistómetro, también conocido como BIER Vessel (*Biological Indicator-Evaluator Resistometer*), es un equipo de prueba que puede entregar muy rápidamente y con exactitud, y controlar con precisión los parámetros de esterilización que son críticos para el proceso. Varias normas desarrolladas por ANSI / AAMI, la ISO y la USP definen condiciones operacionales muy estrictas que se deben cumplir con respecto a los equipos o el BIER

Vessel.

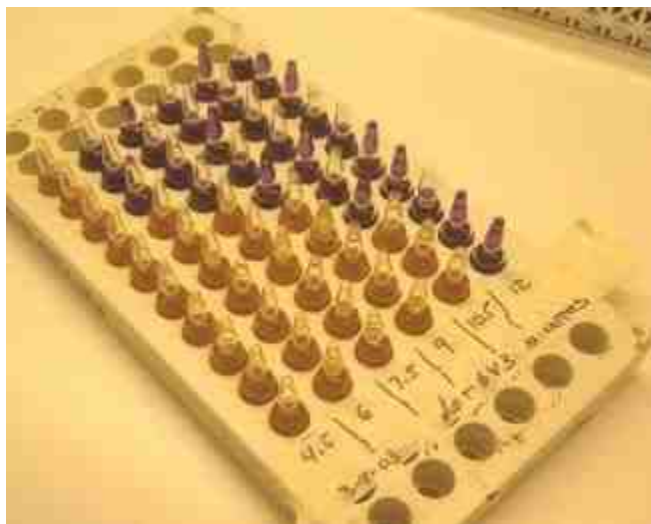
A modo de ejemplo, ANSI / AAMI ST44: 2002 establece que un equipo BIER de vapor debe ser capaz de alcanzar la temperatura seteada dentro de los 10 segundos o menos a partir de que comienza la "carga de vapor", y debe mantener la temperatura dentro del rango de más/ menos 0,5 °C y luego, al final del ciclo, el tiempo de vacío para llegar a la presión atmosférica debe ser de 10 segundos o menos. Además ST44: 2002 establece que el Resistómetro de vapor debe ser capaz de medir condiciones tales como el tiempo (con una resolución de 00:00:01 y exactitud dentro de + / - 00:00:02), la Temperatura (con una resolución de 0.1 °C y una exactitud de + / - 0,5 °C) y la presión (dentro del rango de 0 a 60 psia, con una resolución de 0,1 y exactitud de + / - 0.5 psia). El tiempo de duración de la exposición a una temperatura dada, y dicha temperatura, son entonces controlados tan exactamente como sea posible.

Se puede observar en la Figura 10, un Steam BIER Vessel fabricado por la Corporación de Steris. La cámara del equipo es bastante más pequeña que la cámara de un autoclave. La pequeña cámara es parte del diseño para permitir una carga de vapor extremadamente rápida y un rápido aumento de la temperatura. Un BIER debe ser capaz de alcanzar la temperatura seteada en menos de 10 segundos, y en muchos casos acercarse a los 6 segundos. Esto permite que el "tiempo de exposición" sea muy exacto, lo que es necesario para determinar las características de la resistencia de un IB.

Figura 10. BIER Vessel



Figura 11. IB auto-contenidos en ampollas



Si se llevara a cabo el método de la Fracción Negativa para verificar la resistencia de los IB en un BIER, hay que exponer varios grupos de IB variando el tiempo de exposición. Por ejemplo, si uno desea verificar la resistencia de un IB en particular a 121 °C utilizando el Método de la Fracción Negativa de Spearman-Kärber, se expone un grupo de 20 IB a 121 °C durante 4.5 minutos, 6 minutos, 7.5 minutos, 9 minutos, 10.5 minutos y 12 minutos. Después de las exposiciones cada grupo de IB cuando están en tiras, se transfiere asépticamente a un medio de cultivo. Los IB se incuban a la temperatura apropiada.

En la Figura 11 se muestran ampollas con indicadores biológicos auto-contenidos que fueron utilizados para efectuar la prueba de la Fracción Negativa. El contenido de las ampollas al inicio es de color púrpura y contienen esporas bacterianas. El color es debido a un indicador de pH añadido al Caldo Tripticasa Soya (TSB). Después de la exposición y de la incubación, si las esporas en la ampolla sobrevivieron a la exposición, debido al crecimiento el líquido contenido en la ampolla vira al color amarillo. En el ejemplo de la fotografía observar que

las esporas de las ampollas expuestas en un tiempo de exposición de 4.5 minutos sobrevivieron, y en el tiempo de exposición de 12 minutos, no hubo signo de crecimiento en ninguna ampolla. En el resto de los 4 tiempos de exposición se obtuvo una fracción de ampollas de color púrpura cuando las esporas han sido destruidas. Dicha fracción aumenta a medida que el tiempo de exposición es mayor. De acuerdo a la fracción obtenida en la que no hay desarrollo, o fracción negativa, y de acuerdo al método de Spearman-Kärber se puede determinar la resistencia de los IB o cuál es su resistencia en ese ciclo en particular.

Medios de Recuperación

Diferentes marcas y diferentes lotes tanto de TSB como de TSA (Agar Tripticasa Soya) pueden no tener el mismo grado de capacidad para promover el crecimiento de las esporas cuando están injuriadas. Las marcas 'X', 'Y' y 'Z' de TSA pueden actuar de manera similar para la mayoría de los ensayos típicos dentro del laboratorio, por ejemplo para aislamientos, estriados, etc. de los microorganismos más comunes utilizados. La cuantificación de las UFC de esporas injuriadas de *Geobacillus stearothermophilus* de un IB es un tema diferente. Se han publicado varios artículos que demuestran que entre marca y marca de TSA la recuperación de las esporas injuriadas difieren en términos de Log.

La Tabla 2 ⁽⁵⁾ muestra la variación en la recuperación (expresada en UFC/ IB) entre dos marcas A y B de TSA. Para efectuar el recuento de esporas viables se utilizó el método descrito en la USP capítulo <55>. Se verificó la población de 6 lotes de tiras que contenían esporas de *Geobacillus stearothermophilus*.

Lot # of BIs Tested	Average CFUs (of triplicate plates) Recovered with TSA BRAND A	Average CFUs (of triplicate plates) Recovered with TSA BRAND B
1A	0.3 X 10⁶	1.4 X 10⁶
1B	0.1 X 10⁶	1.0 X 10⁶
2A	0.1 X 10⁶	0.6 X 10⁶
2B	0.1 X 10⁶	0.7 X 10⁶
3A	0.3 X 10⁶	0.9 X 10⁶
3B	0.7 X 10⁶	1.4 X 10⁶

Tabla 2. Resultados comparativos de UFCs

A partir de los dos últimos tubos en la serie de diluciones 1:10, se añadieron alícuotas de 1 ml en cada una de 6 placas de Petri; a 3 de ellas se agregó TSA de la marca A y a las otras 3, TSA de la marca B, siendo la única variable en este ensayo la marca de TSA usado. Fácilmente se puede observar la gran diferencia que existe en la capacidad de recuperación de esporas entre las dos marcas utilizadas. La determinación del valor D cuando se utiliza el método de recuento en placa será diferente si se utiliza un medio u otro.

Los utensilios de laboratorio, el Personal y la Técnica

Bajo este título se pueden agregar otras variables adicionales que harían de la evaluación del Valor D algo aún

más dificultoso. Además de una reciente calibración del BIER, ¿qué pasa con los utensilios de laboratorio tales como pipetas o dosificadores? ¿Son éstos, así como las incubadoras, adecuadamente calibrados y cumplen con los criterios de aceptación? Debemos reconocer que puede haber variabilidad en la precisión entre los técnicos que realizan diluciones en serie o que realizan plaqu coastos. ¿Son todos los ciclos BIER revisados y cumplen especificaciones antes de su aceptación? En cuanto a la colocación de los IB en el BIER y su extracción de la cámara, deben considerarse si su ubicación es consistente entre corridas; si los IB se retiran inmediatamente después de completar el ciclo; si al inicio del ciclo se introducen rápidamente para evitar un sobrecalentamiento; y si la gradilla que contiene los IB ofrece poca o ninguna protección a los indicadores en comparación con el rack que utiliza el fabricante. Todos estos factores pueden sumarse y confirmar exitosamente el resultado de la prueba, que se acepta si la variación es de $\pm$ el 20%.

Considerando todo lo anterior la verificación del valor D que debe estar dentro de la variación aceptable puede ser muy difícil de lograr. La variabilidad de la técnica de un laboratorio a otro es, sin duda un factor que contribuye al problema de la obtención de la verificación de un valor D dentro de los límites permitidos. Esta situación se ve agravada por las diferencias funcionales del equipamiento o del BIER Vessel, y por la calibración como un factor adicional.

Si se contrata una empresa para que efectúe la verificación del Valor D, pueden encontrarse algunos problemas. Incluso con todas las posibilidades mencionadas, algunas verificaciones son exitosas, dando valores dentro del rango $\pm$ 20% permitido. Cuando esto ocurre y se repite con lotes adicionales de IB, sólo se puede suponer que ocurrió algo más que mucha suerte. Tanto el fabricante de BI como el laboratorio de ensayos están ejecutando la prueba de resistencia de una manera muy similar, y ambos están prestando una excelente atención al funcionamiento de los equipos, su calibración y mantenimiento.

Con esto en mente, cuando se trata de verificar un Valor D y surgen problemas, el Laboratorio de Verificación y el fabricante de los IB se deben comunicar para resolver dichos problemas. Los fabricantes de IB quieren que verificación dé bien y deben hacer todo lo posible para ayudar a encontrar qué aspecto de la prueba es la causante del problema. Es posible conseguir la verificación dentro del rango del 20%. Aspectos tales como las diferencias en los medios de cultivo y el método de verificación utilizados, la calibración de los equipos, etc., pueden ser la causa del problema.

En pocas palabras, elija un IB que se ajuste a sus necesidades. Documente el racional por el que eligió ese IB para aplicarlo a ese ciclo en particular. Una auditoría de la FDA puede incluir su racional para la selección del IB, y que el IB que está utilizando cumpla con los requisitos mínimos de *performance*.

Al probar la *performance*, siga todos los aspectos necesarios del procedimiento, el equipo y los medios de cultivo. Si contrata un laboratorio externo para hacer la prueba, audite sus capacidades de prueba. Asegúrese de que tengan un equipo que cumpla AAMI / USP / ISO y los procesos estén calificados. No asuma que si un laboratorio de pruebas dice que los indicadores son compatibles con la USP, entonces realmente cumplen. Solicite los protocolos de los ensayos que van a efectuar, antes de iniciar prueba y si es posible, efectúe una auditoría en el sitio.

Bibliografía:

1. *Journal of Validation Technology*, Feb. 2003
2. Photos compliments of Raven Labs, Omaha Nebraska, Division of Mesa Labs
3. Photos compliments of Raven Labs, Omaha Nebraska, Division of Mesa Labs
4. USP 36. Resistance Performance Tests- *D-Value*, <55>
5. *Infection Control Today*, January 2000
6. Holcomb, R.G., and I.J. Pflug. The Spearman-Kärber Method of Analyzing Quantal Assay Microbial Destruction Data, in *Microbiology and Engineering Sterilization Processes*, ed. I.J. Pflug. St. Paul, MN: Environmental Sterilization Services, 1979.

Control de la Validación de un Proceso de Saneamiento

José E. Martínez

- *Introducción*
- *Definiciones de términos*
- *¿Validación del Sanitizante o del Saneamiento?*
- *El Ciclo de Vida de la Validación de Proceso Aplicado a Saneamiento*
 - Etapas 1 - Diseño de Proceso*
 - Etapas 2 - Calificación del Proceso*
- *Resumen*
- *Bibliografía*

1. Introducción

Las buenas prácticas de fabricación o manufactura (en inglés *Good Manufacturing Practices, GMPs*) requieren que cualquier edificio usado en la fabricación, el procesamiento, el embalaje (empaquete), o almacenamiento de un producto medicinal sea mantenido en condiciones limpias y sanitarias ^(1, 2, 3). También es necesario que existan procedimientos escritos para el uso de los rodenticidas, insecticidas, fungicidas, detergentes y sanitizantes. Además que los equipos y los utensilios sean limpiados, mantenidos, y sanitados a los intervalos apropiados para prevenir el malfuncionamiento o la contaminación que alterarían la seguridad, la calidad, o la pureza del producto medicinal más allá de los requisitos oficiales o establecidos.

Obviamente, la conformidad con el saneamiento es primordial bajo las buenas prácticas de fabricación (BPdF). Sin embargo, pocos en las industrias farmacéuticas y de biotecnología saben cómo los sanitizantes (y los desinfectantes) actúan, y las medidas a tomar para preservar su eficacia. Esta falta de comprensión lleva una carga grande porque ambas industrias gastan mucho tiempo y dinero intentando mantener bajo control las cualidades microbiológicas de sus equipos y ambientes de fabricación, y en última instancia de sus productos.

Muchas personas utilizan expresiones inexactas cuando se refieren a desinfectantes. Por ejemplo, es común confundir los desinfectantes con los sanitizantes. Aunque estos agentes sean similares, pueden no ser los mismos. La desinfección apunta a destruir todos los microorganismos (patógenos y no patógenos) y el saneamiento a la reducción de esos microorganismos a niveles no peligrosos). También es común confundir antisépticos con desinfectantes. Los antisépticos son agentes microbicidas bastante inofensivos que pueden ser aplicados superficies vivas como son la piel y las membranas mucosas (por ejemplo, solución de yodo, alcoholes, 3% peróxido de hidrógeno).

En general, los desinfectantes son agentes químicos que matan los microorganismos, pero no necesariamente sus esporas, no son seguros para el uso a los tejidos vivos y se utilizan en objetos inanimados tales como superficies, pisos, utensilios, etc. Ejemplos de desinfectantes son: hipoclorito de sodio, compuestos de cloro, fenoles, compuestos cuaternarios de amonio, y peróxido de hidrógeno ($\geq 3\%$ v/v).

Normalmente, los desinfectantes y los antisépticos son distinguidos en base a si son seguros para el uso en superficies animadas. A menudo, la seguridad depende de la concentración del compuesto. Por ejemplo, el

hipoclorito de sodio (cloro), según lo añadido al agua es seguro para beber, pero el hipoclorito de sodio al 5%, un desinfectante excelente, no es seguro para beber.

Las industrias farmacéuticas y de biotecnología limpian los equipos con un detergente y utilizan generalmente un agente antimicrobiano para reducir o para eliminar la contaminación microbiana. Estas industrias llaman generalmente al proceso de reducir la contaminación microbiana “desinfección,” aunque el término correcto es “saneamiento” o “sanitización” o “sanitación”. Aquí tenemos tres sinónimos. En inglés también existen varios sinónimos: *sanitization* o *sanitation* o *sanitisation*.

Debido a que las superficies son inanimadas, deben correctamente ser llamadas contaminadas, en lugar de infectadas. Más aún, las superficies deben estar previamente contaminadas con microorganismos patógenos antes de proceder a desinfectarlas. Es importante conocer que la probabilidad de encontrar un patógeno verdadero en un ambiente que cumpla con las BPdF es muy baja. Así, la desinfección, según lo definido correctamente, no es necesaria. Por lo tanto, debemos referirnos al saneamiento y no a la desinfección. Además no puede conocerse cuándo un microorganismo saprófito puede transformarse en patógeno ya que dependerá de las defensas de una persona. Por otra parte, existen los microorganismos objetables que son por el momento responsabilidad del elaborador

El saneamiento es un proceso de naturaleza similar a la limpieza y por ende debe ser seguro y efectivo bajo condiciones normales de uso. Esto conlleva una validación del proceso de saneamiento según se estipula bajo las normativas internacionales y nacionales. Una vez que se completa la validación es preciso asegurar que el proceso no sufra cambios intencionales o inadvertidos que afecten la seguridad y eficacia del saneamiento. Consecuentemente tenemos que el control de la eficacia de los sanitizantes y desinfectantes se asegura por medio del ciclo de vida de la validación de procesos según las prácticas reconocidas en las industrias farmacéuticas y de biotecnología.

2. Definiciones de Términos

A continuación se presentan definiciones de términos, según lo publicado por Gilbert y McBain y la Administración de Alimentos y Drogas (en inglés *Food and Drug Administration* o *FDA*) de los EUA ^(4, 5).

Antiséptico: Una formulación que contiene agentes germicidas, microbicidas, o bactericidas que son seguros para el uso en organismos vivos ⁽⁴⁾.

Concentración Bactericida Mínima (MBC): La concentración de producto biocida que mata o desactiva a más del 99,9% de microorganismos en una prueba in vitro ⁽⁴⁾.

Concentración Inhibitoria Mínima (MIC): La concentración más baja de un agente antibacteriano que inhibe el crecimiento visible (es decir, colonias en una placa o la turbiedad en un cultivo de caldo) bajo condiciones de prueba estándar ⁽⁴⁾.

Desinfectante: Una sustancia que ayuda a eliminar microorganismos indeseables de superficies ambientales inanimadas. Porque estas superficies están inanimadas, se consideran contaminadas, no infectadas ⁽⁵⁾.

Desinfección: La remoción o la destrucción de patógenos de objetos inanimados. Los organismos ambientales que no son patógenos no se pueden eliminar totalmente con la desinfección ⁽⁵⁾.

Esporicida: Una sustancia usada para matar a las esporas de bacterias y hongos ⁽⁴⁾.

Resistencia: La insensibilidad relativa de un microorganismo a un tratamiento particular bajo sistema de condiciones especificadas. Para los agentes antibacterianos, la resistencia se cuantifica generalmente como la concentración mínima requerida teniendo un efecto definible (es decir, inhibición del crecimiento) sobre una población de células ⁽⁴⁾.

Saneamiento (Sanitización): El mantenimiento de las condiciones limpias que prevengan la introducción de patógenos y de otros contaminantes potencialmente dañinos durante el manejo de comida, productos para el uso en seres humanos y en los productos veterinarios ⁽⁵⁾.

Sanitizante: Una sustancia química o un agente físico que reduce los niveles de contaminación de microorganismos en superficies ambientales inanimadas ⁽⁵⁾.

3. ¿Validación del Sanitizante o del Saneamiento?

Aunque los reguladores nunca han definido formalmente la “validación de desinfectantes (sanitizantes)”, las agencias reguladoras citan con frecuencia fracasos en asegurar la desinfección (saneamiento) apropiada.

Aunque hablemos comúnmente de la “validación de desinfectantes”, la agencia federal para la FDA de los EUA establece que los procesos tienen que ser validados ⁽⁶⁾. El desinfectante no se puede validar porque no es un proceso. Entonces bajo este argumento los desinfectantes se califican (cualifican). Es decir, se demuestra que son eficaces en el contexto de un proceso dado. Por ejemplo, se califica la fuente de vapor de agua para un autoclave y después se valida el proceso de la esterilización. El acercamiento a la desinfección debe ser similar, de modo que una definición de trabajo para la validación de un proceso de desinfección “estableciera pruebas documentadas de que el proceso de desinfección consistentemente desactivará o matará posibles o conocidos patógenos de objetos inanimados.”

El párrafo anterior también aplica idénticamente a los sanitizantes. Los sanitizantes no se validan, se califican. Pero como explico en la introducción de este documento el proceso que se utiliza en las industrias farmacéuticas y de biotecnología es el de saneamiento. Por lo tanto el proceso de saneamiento es el que se valida.

Para propósitos de este documento podemos establecer que la definición de la validación del proceso de saneamiento es como sigue: “establecer pruebas documentadas de que el proceso de saneamiento reducirá consistentemente las poblaciones de microorganismos en superficies inanimadas a los niveles preestablecidos que se consideren seguros”. Los niveles microbianos pre-establecidos se deben basar en códigos de salud pública, regulaciones (normativas), pautas de la industria, o un análisis científico razonado.

Es menester informar que a partir de este momento se debe entender que el vocabulario referente a saneamiento mencionado también aplicará a la desinfección y viceversa.

4. El Ciclo de Vida de la Validación de Proceso Aplicado a Saneamiento

El ciclo de vida de la validación es un mecanismo de implantación que define la organización y la ejecución de las actividades de una validación. Un considerable cuerpo de referencias existe que identifica cómo validar procesos de diversos tipos y descripciones por lo que en este documento no pretende entrar en los detalles de los procesos de validaciones. La intención es proporcionar guía en como el ciclo de vida de la validación es importante para el control de la eficacia de sanitizantes y desinfectantes.

La validación de proceso implica una serie de actividades que ocurren durante el ciclo vital del producto y del proceso. Estas actividades están discutidas a cabalidad en documentos ANSI/AAMI/ISO y en otras publicaciones ⁽⁶⁻¹⁴⁾. Como el saneamiento no es un proceso que requiere los mismos detalles como la fabricación de un producto farmacéutico o un dispositivo médico el ciclo de vida no es complicado. Por esta razón el modelo de ciclo de vida a utilizarse es el presentado en la guía de la FDA de EUA para la validación de procesos. El título de esta guía es *Process Validation: General Principles and Practices*, en español se traduce como “Validación de Proceso: Principios y Prácticas Generales”. Este documento fue publicado en enero de 2011 ⁽⁶⁾. (De ahora en adelante la *guía-FDA*.).

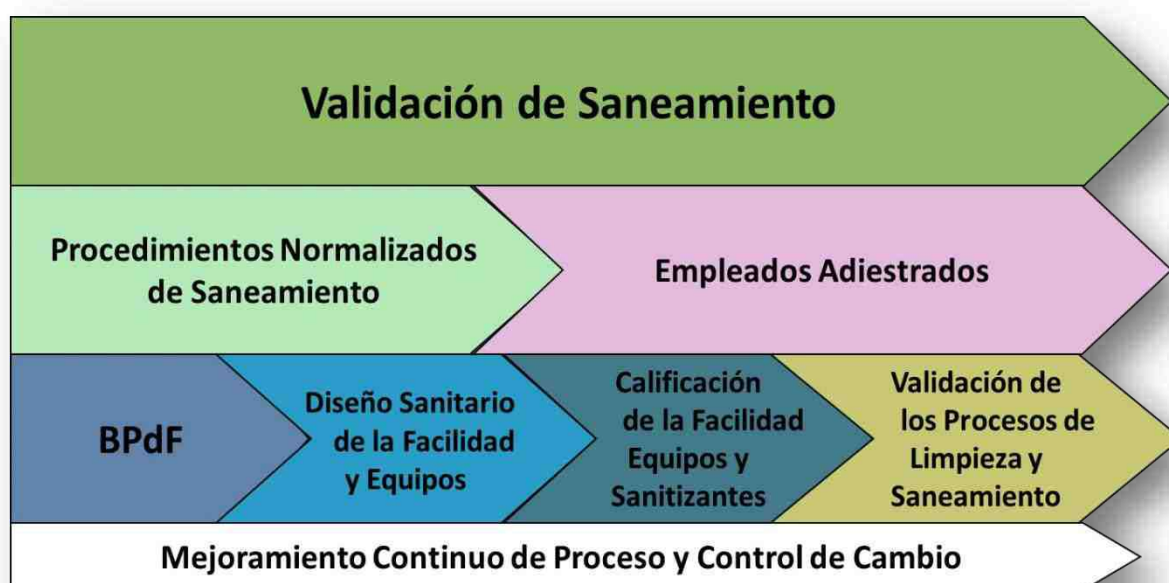
La guía-FDA describe las actividades para la validación de un proceso en tres etapas:

- Etapa 1 - *Diseño de proceso*: En esta etapa el proceso se define basado en el conocimiento ganado con las actividades de investigación y desarrollo.
- Etapa 2 - *Calificación de proceso*: Durante esta etapa, el diseño de proceso se evalúa para determinar si el proceso es capaz de una ejecución reproducible y eficaz.
- Etapa 3 - *Verificación de proceso continua*: La garantía continua se obtiene durante la ejecución rutinaria que demuestra que el proceso se encuentra en un estado de control.

La Figura 1 presenta un esquema del ciclo de vida de la validación.

En adición, basado en la guía-FDA, se puede establecer que un programa acertado de la validación dependerá de la información y del conocimiento del sanitizante y del desarrollo de proceso de saneamiento. Y que este conocimiento y la comprensión del proceso son la base para establecer el enfoque para el control del proceso de saneamiento que da lugar a superficies con las cualidades microbiológicas deseadas.

Figura 1: Esquema de la Validación de Saneamiento



Las personas a cargo deben:

- Entender las fuentes de variación
- Detectar la presencia y el grado de variación
- Entender el impacto de la variación en el saneamiento y su efecto en la carga microbiana en las superficies.
- Controlar la variación de una forma proporcional con el riesgo que representa al saneamiento y a la carga microbiana en las superficies.

4.1 Etapa 1 - Diseño de Proceso

La meta de esta etapa es diseñar un proceso conveniente para el saneamiento rutinario que pueda cumplir con los atributos microbiológicos especificados para las superficies.

El saneamiento comienza con una limpieza apropiada. Los residuos como grasas, aceites y proteínas pueden evitar que el sanitizante entre en contacto físico con la superficie que necesita ser sanitizada. Además, la presencia de residuos orgánicos puede inactivar o reducir la efectividad de algunos tipos de sanitizantes (ej. hipocloritos) volviendo el proceso ineficaz. Una limpieza eficaz debe ser demostrada mediante la validación del proceso de limpieza.

La validación de limpieza contiene una serie de pre-requisitos mínimos que son también necesarios para la validación del saneamiento.

- Todos los equipos y utensilios deberán estar diseñados de tal forma y contruidos con un material que permita la limpieza y el mantenimiento necesario.
- El diseño, construcción y uso de los equipos y utensilios deberá prevenir la contaminación con lubricantes, combustible, fragmentos metálicos, agua inapta para el consumo o cualquier otra fuente de contaminación.
- Las superficies de contacto deben ser resistentes a la corrosión, contruidos de materiales no tóxicos, y diseñadas para resistir el uso previsto para éstas, más la acción de los detergentes y sanitizantes.

Una validación de limpieza debe contener los siguientes elementos:

- Clase de detergente y concentración
- Temperatura del agua

- Dureza del agua
- pH del agua
- Período de contacto
- Método de aplicación del detergente (limpieza en sitio, aspersión, manual, etc.)
- Método de secado de las superficies después de la limpieza.

Una vez que el proceso de limpieza es desplegado se procede a desarrollar el proceso de saneamiento. Para el proceso de saneamiento es importante considerar la carga microbiana de la superficie a sanitizar. Si las bacterias se encuentran en un estado vegetativo son fáciles de eliminar, pero no así si se encuentran como esporas ya que estas últimas son altamente resistentes. También cuando se está desarrollando un procedimiento de saneamiento es necesario tener en consideración el impacto ambiental y el costo vs. efectividad del sanitizante.

Un sanitizante se elige básicamente a base de los siguientes parámetros:

- Tipo y número de microbios presentes sobre la superficie
- El espectro de la actividad deseada (por ejemplo, bacterias vegetativas vs. esporas)
- Tipo de superficie que se sanitizará y su compatibilidad con el sanitizante
- La posible necesidad de mantener una actividad microbicida residual sobre la superficie
- Potencial para la corrosión o el deterioro de la superficie
- Posibles efectos del sanitizante al producto fabricado
- La posible rotación de sanitizantes (por ejemplo., bactericida y esporicida)
- Seguridad de los empleados.

Una validación de saneamiento contiene los mismos elementos que la validación de limpieza, excepto que se reemplaza al detergente por el sanitizante.

Calificación del Sanitizante mediante pruebas

Para la validación del proceso de saneamiento es de importancia extrema también calificar el sanitizante. Pero la pregunta es: ¿Cómo se califica un sanitizante?. Un sanitizante debe ser calificado a base de la demostración de su eficacia como bactericida, fungicida, esporicida o de amplio espectro; según su uso pre-determinado.

Existen numerosos estándares de como demostrar la eficacia de desinfectantes y antisépticos, pero estos no mencionan la palabra sanitizante. En realidad esto no debe ser motivo de preocupación debido a que un agente anti-microbiano puede ser clasificado como desinfectante o sanitizante dependiendo de la intención con la cual sea utilizado. Si es usado para matar posibles microorganismos patógenos o verdaderos patógenos entonces es un desinfectante. Ahora si es utilizado para reducir la carga microbiana de una superficie entonces es un sanitizante. Si un agente anti-microbiano ha demostrado su eficacia como desinfectante entonces se puede deducir lógicamente que también será eficaz como sanitizante.

Las pruebas de desinfectantes tienen sus orígenes en la década de 1880 junto a los orígenes de la microbiología cuando Robert Koch inoculó las esporas de ántrax sobre hilos de seda. Luego sumergía los hilos en desinfectantes y después cultivaba los hilos en medios de cultivos o los inoculaba en animales de laboratorio.

Una de las primeras evaluaciones estandarizadas para la actividad de los desinfectantes fue la prueba de Rideal- Walker ⁽¹⁵⁾, que comparaba al desinfectante bajo prueba con un desinfectante estándar (fenol), el resultado que era expresado como coeficiente de actividad, mejor conocido como "coeficiente de fenol". Esta prueba fue modificada para incluir materia orgánica en la prueba de Chick-Martin, otra prueba de coeficiente de fenol. Sin embargo, el concepto de comparar un desinfectante a un compuesto arbitrario de referencia generaba información limitada sobre los atributos de un desinfectante y de cómo utilizarlo. Otra deficiencia en las pruebas de coeficiente de fenol era un aumento evidente de la actividad microbicida

causado por el remanente de desinfectante en la fase de la recuperación. No obstante a las deficiencias presentadas por las pruebas de coeficiente de fenol estas continuaron en uso hasta la década de 1960.

La prueba de Kelsey-Sykes, primero publicada en el 1969 en el Reino Unido, con una versión mejorada en 1974, modeló la dilución progresiva y la contaminación que un desinfectante puede encontrar durante el uso y también incluyó la neutralización del desinfectante durante el muestreo ⁽¹⁶⁾. El resultado obtenido por esta prueba era en una concentración de desinfectante apropiada para el uso en condiciones limpias o sucias en lugar de una comparación arbitraria. Luego se desarrollaron una multiplicidad de pruebas de desinfectantes químicos por los diversos organismos de estandarización nacionales tanto en América como en Europa. Afortunadamente esta multiplicidad de pruebas está siendo substituida por estándares internacionales.

El capítulo 1072 (*USP 1072*), Desinfectantes y Antisépticos (en inglés: *Disinfectants and Antiseptics*), de la farmacopea de EUA (*USP - USA*) provee una guía básica sobre desinfectantes ⁽¹⁷⁾. Este capítulo, que es informativo y no normativo, discute la selección de desinfectantes y de antisépticos químicos; la demostración de su eficacia bactericida, fungicida, y esporicida; el uso de desinfectantes en el área de fabricación farmacéutica aséptica y no-aséptica; y consideraciones normativas y de la seguridad. No se incluye información específica sobre la validación del proceso de desinfección o saneamiento.

Se instruye en el *USP 1072* que la eficacia anti-microbiana se obtiene mediante las pruebas de la eficacia de desinfectantes (en inglés *Disinfectant Effectiveness Tests* o *DETs*). Las pruebas del AOAC incluyen la prueba de portador (*carrier test*) y la prueba de dilución-uso para la actividad bactericida. Igualmente se incluyen pruebas para micobactericidas y esporicidas. El *USP 1072* se limita a indicar que en los EUA los métodos de pruebas para desinfectantes oficiales son publicados por la AOAC Internacional (*AOAC International*) ⁽¹⁸⁾. AOAC es un acrónimo para la *Association of Official Analytical Chemists* (en español: Asociación Oficial de Químicos Analíticos).

Los EUA y la Unión Europea (UE) requieren a las compañías que registran productos antimicrobianos tales como desinfectantes, sanitizantes, esporicidas, y agentes esterilizantes, que tienen que asegurar la seguridad y la eficacia de sus productos antes de que se vendan o se distribuyan. Las compañías que registran estos productos deben abordar la composición química de su producto, incluyendo datos toxicológicos para documentar que su producto es seguro si es utilizado según lo escrito en la etiqueta. Sobre todo deben incluir los datos de la eficacia para documentar sus demandas de la actividad microbiana contra organismos específicos y para apoyar las direcciones de uso establecidas en la etiqueta.

Las pruebas del AOAC no son los únicos medios de recopilar datos de efectividad antimicrobiana a nivel internacional. En la mayor parte de Europa los estándares reconocidos de *DETs* vienen del enfoque sistemático del Comité Técnico del Programa de Trabajo conocido como "CEN 216 – Desinfectantes y Antisépticos Químicos" (*Technical Committee for TC 216 Work Program, "Chemical Disinfectants and Antiseptics"*) ⁽¹⁹⁾ bajo el Comité Europeo para la Normalización (*European Committee for Normalization* o *CEN*). El CEN utiliza los métodos de la *Association Française de Normalisation* (AFNOR), entre otros, para el estudio de la efectividad antimicrobiana.

La metodología desarrollada por CEN 216 tiene tres fases a saber:

- Fase 1: Pruebas de suspensión cuantitativa bajo condiciones limpias para la actividad básica del desinfectante.
- Fase 2, Paso 1: Prueba de suspensión cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.
- Fase 2, Paso 2: Prueba de superficie cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.
- Fase 3: Pruebas de campo bajo las condiciones actuales de uso.

La Tabla 1 presenta una descripción más detallada de la metodología CEN 216, mientras la Tabla 2 lista los estándares publicados por CEN 216 con aplicación industrial.

Tabla 1: Metodología CEN 216 para las pruebas de la eficacia de desinfectantes

Fase	Tipo de Prueba	Propósito
Fase 1	Prueba de suspensión cuantitativa bajo condiciones limpias para la actividad básica del desinfectante.	Para establecer que un producto tiene actividad bactericida y/o fungicida sin consideración alguna hacia las condiciones específicas del uso previsto. Si el producto pasa, califica para las pruebas adicionales.
Fase 2 Paso 1	Prueba de suspensión cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.	Para establecer que un producto tiene actividad bactericida y/o fungicida, y/o esporicida y/o antivirica, y/o tuberculocida, etc, bajo condiciones apropiadas a su uso destinado bajo pruebas en condiciones de laboratorio. Si el producto pasa, califica para reclamos genéricos de desinfectancia.
Fase 2 Paso 2	Prueba de superficie cuantitativa bajo las condiciones representativas de uso.	Pruebas adicionales de laboratorio como las pruebas del lavado de manos y la frotación de manos, y las pruebas en superficies inertes para establecer que los productos tienen actividad microbicida contra los microorganismos pegados a una superficie. Si el producto pasa, califica para reclamos de desinfectancia en superficies.
Fase 3	Pruebas de campo bajo las condiciones actuales de uso.	Pruebas confirmatorias que confirman los resultados de las fases 1 y 2.

Tabla 2: Estándares Publicados por CEN 216

Norma tiva	Título
EN 1040:2005	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida básica de desinfectantes y de antisépticos químicos- Método de prueba y requisitos (fase 1).
EN 12353:2006	Desinfectantes y antisépticos químicos- Conservación de microorganismos de prueba utilizados para la determinación de la actividad bactericida, micobactericida, esporicida y fungicida.
EN 1275:2005	Desinfectantes y antisépticos químicos-prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad básica fungicida o levaduricida- Método de prueba y requisitos (fase1).
EN 1276:2009	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN1276:2009/ AC:2010	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de actividad bactericida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 13610:2002	Desinfectantes químicos- prueba de suspensión cuantitativa para la evaluación de actividad antivirica contra bacteriófagos de desinfectantes químicos utilizados en alimentos y áreas industriales- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 13697:2001	Desinfectantes y antisépticos químicos- prueba de suspensión cuantitativa para superficies no porosas para evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de desinfectantes químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales- Método de prueba y requisitos (fase 2/ paso 2).
EN 13704:2002	Desinfectantes químicos- prueba de suspensión cuantitativa para la evaluación de la actividad esporicida de desinfectantes químicos utilizados en alimentos y áreas industriales - Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).
EN 14885:2006	Desinfectantes y antisépticos químicos- La aplicación de los estándares europeos para desinfectantes y antisépticos químicos.
EN 1499:1997	Desinfectantes y antisépticos químicos- Lavado higiénico de manos- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 2).
EN 1500:1997	Desinfectantes y antisépticos químicos- Frotación higiénica de manos- Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 2).
EN 1650:2008	Desinfectantes y antisépticos químicos- Prueba de suspensión cuantitativa para evaluación de la actividad fungicida y levaduricida de desinfectantes y antisépticos químicos utilizados en alimentos, industrias, áreas domésticas y áreas institucionales - Método de prueba y requisitos (fase 2, paso 1).

Las pruebas de la eficacia de desinfectantes no son pruebas rutinarias en los laboratorios que sirven a las industrias farmacéuticas y de biotecnología, por lo que la mayoría de los microbiólogos en estas industrias no son familiares con ellas. Los protocolos de ejecución toman mucho tiempo para aprender y un tiempo extenso para ejecutarse, lo que las hace costosas. Además, son difíciles de ejecutar y se hacen infrecuentemente, lo que previene mantener personal de laboratorio diestro y originar resultados reproducibles.

La reproducibilidad es crítica para la interpretación apropiada de resultados producidos por *DETs*. La variabilidad en las pruebas del AOAC es causada sobre todo por errores en la preparación de las soluciones y en los medios de cultivos empleados en las pruebas. Algunos estudios han mostrado, sin embargo, que la técnica en las pruebas del AOAC ^(20, 21) y la preparación del inóculo ⁽²²⁾ pueden también introducir mucha variación. Las variaciones en condiciones durante la conservación en cámara frigorífica (por ejemplo, refrigeración, congelación, liofilización) pueden afectar al genotipo predominante en la cepa de cultivo o en la cepa madre ⁽²³⁾. Así, cuando las compañías intentan calificar los desinfectantes (sanitizantes) usando los protocolos del AOAC, pueden no poder reproducir las reclamaciones microbidas en las etiqueta de los fabricantes de desinfectantes. Las pruebas del CEN 216 padecen también de los problemas de reproducibilidad causados por la variación en la preparación del inóculo y la cantidad del inóculo ^(24, 25).

4.2 Etapa 2 - Calificación del Proceso

Durante la etapa de la calificación del proceso (en inglés *Process Qualification* o *PQ*) de la validación del proceso, el diseño del proceso se evalúa para determinar si el proceso es reproducible. Esta etapa tiene dos elementos: diseño / calificación del equipo y de las utilidades (servicios), y la calificación del funcionamiento del proceso (en inglés *Process Performance Qualification* o *PPQ*). Aquí, el término calificación se refiere a las actividades emprendidas para demostrar que las utilidades y el equipo son convenientes para su uso previsto y que su desempeño es correcto. Estas actividades preceden los procesos de validación de la limpieza y del saneamiento.

4.2.1 Calificación de las Utilidades y el Equipo

La calificación de las utilidades y del equipo incluye generalmente las actividades siguientes:

- Selección de los materiales de construcción de las utilidades (servicios) y del equipo, fundamentos de funcionamiento, y características de desempeño a base de si son apropiadas para sus aplicaciones específicas.
- Confirmación de que los sistemas y el equipo estén contruidos e instalados de acuerdo con las especificaciones del diseño.
- Confirmación de que los sistemas y el equipo operan de acuerdo con los requisitos de proceso en todos los alcances de operación anticipados.

4.2.2 Calificación del Desempeño del Proceso (PPQ)

El *PPQ* combina las utilidades y el equipo (calificados previo a esta fase), las personas adiestradas en los procesos de limpieza y de saneamiento, los procedimientos normalizados de operación, y los materiales requeridos. Un *PPQ* exitoso confirmará el diseño del proceso y demostrará que el proceso de saneamiento se desempeña como diseñado.

Desafortunadamente las pruebas para la eficacia de los desinfectantes no reflejan condiciones de uso. El inóculo de microorganismos usado en la prueba de *DETs* no imita el comportamiento del crecimiento ambiental microbiano (por ejemplo, bio-películas y microorganismos adheridos a superficies). Además, los *DETs* fallan en considerar los efectos de la etapa precedente de limpieza. Por lo tanto, las condiciones de prueba usadas por los fabricantes de los desinfectantes y los sanitizantes tienen poca relación a los procesos de saneamiento usados en las industrias farmacéuticas y de biotecnología. Los fabricantes de desinfectantes confían en la prueba de portador (*carrier test*) y la prueba de dilución-uso para proporcionar

los datos para el registro en los EUA y en Europa para las concentraciones recomendadas de uso.

La validación de un proceso de saneamiento se debe basar en pruebas empíricas (de campo) para la eficacia de sanitizantes (desinfectantes) en condiciones actuales de uso, sugiriendo la relación lógica:

pruebas exitosas de campo bajo condiciones de uso = validación.

Para los desinfectantes y sanitizantes registrado en los EUA o en la UE no habría necesidad de realizar pruebas de DETs en los laboratorios que dan servicios a las compañías. Los DETs realizados por los fabricantes para el registro deben ser suficientes para asegurar la acción biocida del sanitizante y para su selección inicial. Existe experiencia abundante que demuestra que los desinfectantes y los sanitizantes son más eficaces en uso real que indicado por DETs. Además, las altas concentraciones de microorganismos en los inóculos usados en los estudios de laboratorio representan una “peor situación” (*worst-case*) a la que se puede enfrentarse un sanitizante para uso en las industrias farmacéuticas y de biotecnología. Debemos, por lo tanto, poder contar en una segunda relación lógica:

registro = calificación.

Este enfoque haría los DETs realizados en las compañías farmacéuticas y de biotecnología innecesarios, y simplificaría grandemente el proceso de la validación del saneamiento quitando del medio a el paso más difícil; ejecución de DETs. Solamente los desinfectantes o sanitizantes que no se han registrado para el propósito previsto entonces requerirían la calificación adicional con DETs.

Las pruebas de superficies todavía serían requeridas para desarrollar los procedimientos de los procesos de saneamiento. Estas pruebas evaluarían la eficacia del sanitizante (desinfectante) seleccionado contra microorganismos adheridos a superficies. En estos análisis, los microorganismos se secan sobre superficies, son expuestos a un sanitizante, y después son aislados para enumerarlos por técnicas convencionales o por métodos microbiológicos rápidos. Las pruebas superficiales convencionales son fáciles de ejecutar y son baratas. También se pueden realizar por la mayoría de los laboratorios de microbiología. Las pruebas de superficie pueden reflejar condiciones normalmente utilizadas como los tiempos de contacto, la temperatura de uso, las diluciones de uso, y las propiedades de las superficies. Estas pruebas se pueden modificar para realizarse después de una limpieza representativa por lo que imitarían mejor las condiciones actuales de uso. El proceso propuesto de saneamiento sería desarrollado a base de las pruebas de superficie. Finalmente, el proceso propuesto de saneamiento sería validado mediante los desafíos impuestos en pruebas de campo en condiciones de uso reales.

La validación del proceso de saneamiento entonces sería realizada mediante una metodología simple:

- limpieza del equipo
- saneamiento del equipo
- toma de muestras para carga microbiana.

5. Resumen

La validación de los sanitizantes y desinfectantes parece ser una tarea complicada, pero en realidad no lo es. Estos agentes químicos no se validan; se califican para el propósito previsto, y entonces el proceso de saneamiento es el que se valida. La parte más difícil de la validación del proceso del saneamiento sería la ejecución de las pruebas DETs por el usuario. Las pruebas de DETs son superfluas cuando el sanitizante (desinfectante) seleccionado ha sido registrado adecuadamente. La metodología de la validación del proceso de saneamiento tiene que incluir la limpieza como parte del proceso de saneamiento. De este modo la validación del proceso de saneamiento se convierte en la ejecución acertada de pruebas de campo bajo condiciones reales

de uso. Esta metodología es rentable, simple y ahorra tiempo.

Después de la validación el mantenimiento de la eficacia de sanitizantes y desinfectantes se rige por medio del control de cambios del ciclo de validación. El control de cambios aseguraría que los cambios en los siguientes elementos no afectarían el proceso validado:

- facilidades
- equipo
- procedimientos normalizados de limpieza y saneamiento.

En su expresión holística el control de la eficacia de sanitizantes (desinfectantes) se logra mediante la aplicación estricta de un programa de limpieza y saneamiento que incluya procedimientos de evaluación periódica.

6. Bibliografía:

1. Disposición 2819/2004 ANMAT; “Apruébanse los lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos.
2. NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
3. Title 21- Food and Drugs; Part 211- Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals. http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfr211_main_02.tpl, accesado en Aug 05, 2011.
4. P. Gilbert and A.J. McBain, “Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance,” Clin. Microbiol. Rev. 16 (2), 189-208, 2003.
5. FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, “Comprehensive List of Terms,” disponible en <http://www.gchd.org/NFSEM/a2z-term.html>, accessed Aug 05, 2011.
6. Food and Drug Administration, EUA, “Process Validation: General Principles and Practices”, Rev. A. January 2011.
7. ANSI/AAMI/ISO 11135-1:2007, Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, 4^{ed}.
8. ANSI/AAMI/ISO 11607-2:2006/(R) 2010, Packaging for terminally sterilized medical devices - Part 2: Validation requirements for forming, sealing and assembly processes, 1^{ed}.
9. ANSI/AAMI/ISO 14937:2009, Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, 2^{ed}.
10. ANSI/AAMI/ISO 20857:2010, Sterilization of health care products - Dry heat: Requirements for the development, validation and routine control of an industrial sterilization process for medical devices, 1^{ed}.
11. AAMI TIR36:2007, Validation of software for regulated processes, 1^{ed}.
12. ICH Q10, Pharmaceutical Quality System. April 2009.
13. FDA/Global Harmonization Task Force (GHTF; medical devices), Quality Management Systems – Process Validation, edition 2, guidance, January 2004.
14. FDA/ICH Q7, Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients, guidance for industry, August 2001.
15. S. Rideal, J.T.A. Walker. Standardization of disinfectants. Journal of the Sanitary Institute, London 24, 424-441, 1903.
16. J.C. Kelsey, I.M. Maurer. An improved Kelsey-Sykes test for disinfectants. The Pharmaceutical Journal, 207,

528-530, 1974.

17. USP <1072> Disinfectants and Antiseptics. United States Pharmacopeia (USP 34–NF 29), 2011.
18. AOAC International Official Methods of Analysis, 15th, 16th, and 17th editions. Arlington, VA.
19. Chemical Disinfectants and Antiseptics: CEN/TC 216.
http://www2.afnor.org/espace_normalisation/structure.aspx?lang=english&commid=1912.
20. E.C. Cole, W.A. Rutala, G.P. Samsa. "Disinfectant Testing Using A Modified Use-Dilution Method: Collaborative Study," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (6), 1187–1194, 1988.
21. E.C. Cole, W.A. Rutala. "Bacterial Numbers on Penicylinders Used in Disinfectant Testing: Use of 24 Hour Adjusted Broth Cultures," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 (1), 9–11, 1988.
22. E.C. Cole, W.A. Rutala, J.L. Carson. "Evaluation of Penicylinders Used in Disinfectant Testing: Bacterial Attachment and Surface Texture," *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (5), 903–906, 1987.
23. S.F. Bloomfield et al., "Development of Reproducible Test Inocula for Disinfectant Testing," *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 36 (3–4), 311–331, 1995.
24. M.D. Johnston, E.A. Simons, R.J.W. Lambert. "One Explanation for the Variability of the Bacterial Suspension Test," *J. Appl. Microbiology* 88 (2), 237–250, 2000.
25. S.B.I. Luppens, F.M. Rombouts, T. Abee. "Disinfectants in a Suspension Test," *J. Food Prot.* 65 (1), 124–129 (2002).

Conservadores en productos farmacéuticos y cosméticos

Miguel D'Aquino y Sergio A.Teves

- *Introducción*
- *Efectividad de los conservadores de acuerdo a diferentes metodologías*
- *Procedimientos:*
 - *CTFA, ASTM, USP, BP, UE*
 - *Otros procedimientos*
 - *Ensayos de capacidad*
- *Empleo de antagonistas o neutralizadores*
- *Bibliografía*

Introducción

Los conservadores son sustancias individuales o mezclas que se encuentran en productos cosméticos y algunos productos farmacéuticos a fin de que se mantengan preservados de una contaminación microbiana durante su uso y/o almacenamiento evitar de esta forma una alteración del producto (física, química u organoléptica) o un daño de tipo patogénico sobre el usuario (daño sanitario), ambas situaciones son causa de reclamos por parte del usuario con el consiguiente daño económico.

Si un preparado Farmacéutico/ cosmético no posee por sí, una adecuada actividad antimicrobiana, debe añadirse un protector que es un agente químico conservador, en especial a los preparados acuosos.

Los fármacos o cosméticos, pueden contaminarse durante su producción a través de materias primas, u operaciones no adecuadas; o durante su uso (especialmente en envases multidosis) sobre todo si el producto permite el desarrollo microbiano, lo que se traduciría como ya se ha dicho, en alteraciones de tipo sanitario (infecciones, intoxicaciones, etc.) o de tipo económico (deterioro en general). La calidad debe mantenerse durante el almacenamiento y uso. Tanto la ausencia de patógenos como la biocarga microbiana, no debe supeditarse solamente a la presencia de conservadores, sino que requiere como hecho principal el respeto de las Normas de Buenas Prácticas en la elaboración así como el tener en cuenta las distintas condiciones y factores que llevan a una contaminación.

Como los microorganismos poseen la capacidad de contaminar a estos productos, durante las etapas de elaboración y/o uso, estos compuestos conservadores son agregados principalmente para asegurar una estabilidad continua y seguridad de los mismos. Pero se deberá tener en cuenta que la principal prevención es trabajar con las normas de Buenas Prácticas de Elaboración y no utilizar compuestos inhibidores para "corregir" falencias de fabricación. Por eso existen además, técnicas protectoras (áreas limpias con aire filtrado, aisladores, etc.) que pueden utilizarse en forma aislada o combinada con alguno de los conservadores.

Este problema posee mayor relevancia en los productos no esterilizados y por lo tanto pueden dar lugar a un riesgo potencial, especialmente en aquellas personas con defensas disminuidas. Por lo que el uso de estos compuestos reduce la probabilidad del crecimiento microbiano en los productos principalmente acuosos, así como minimizan la posibilidad de supervivencia en productos no acuosos. La carga microbiana deberá reducirse

a un nivel aceptable para la seguridad del producto. Se tendrá en cuenta que los requisitos de nutrientes de la mayoría de organismos saprófitos causantes de deterioro, se hallan por lo común en casi todas las formas farmacéuticas y cosméticas, muchos ingredientes son fácilmente biodegradables de igual forma que cantidades trazas de residuos químicos contaminantes. El agua de uso farmacéutico puede contener trazas suficientes que permiten el crecimiento de muchos pseudomonadales y otras especies que habitualmente se asocian a alteración de productos, dado que el agua es ampliamente utilizada en estas industrias, tanto como materia prima o participando de algún proceso de producción ⁽¹⁾.

Los compuestos añadidos a estos productos, también se los conoce como aditivos antimicrobianos, que se refiere a cualquier sustancia que no permita la multiplicación de los microorganismos, ya sea por una acción inhibitoria (*microbiostática*) o por una acción destructiva (*microbicida*) ⁽²⁾

¿Como actúan los microorganismos en una contaminación?

Estos organismos poseen diversas actividades metabólicas las cuales conducen a una variedad amplia de alteraciones o daños para el producto o usuario respectivamente, así como en la estabilidad del producto si se permite su persistencia.

Las diversas Farmacopeas establecen límites para la presencia de microorganismos en los fármacos, los cuales varían según el producto, su uso y las características del usuario final. Otras codificaciones y diversos investigadores discuten sobre las diversas regulaciones que deberían existir al respecto tanto para fármacos como para cosméticos.

Sobre los microorganismos que participan en esta acción los informes más comunes se refieren a pseudomonadales y otras bacterias Gram negativas en productos acuosos, mientras que en productos secos, tales como tabletas o polvos, se encuentran esporos tanto bacterianos como de hongos así como estafilococos y corynebacterias. El significado clínico sobre los medicamentos ha sido discutido por varios autores ⁽¹⁻³⁻⁴⁾ y también las implicancias sobre el deterioro de producto ⁽⁵⁻⁶⁾.

Se deberá considerar por otra parte la constitución de un sistema preservativo ⁽⁷⁾, que no es sólo la sustancia que se añade como tal sino que además involucra a la formulación del producto medicinal o cosmético ya que la sustancia no obra independientemente de ésta; existen factores que inciden favorablemente o negativamente sobre la sustancia conservadora ⁽⁸⁾, tal como el pH, sustancias orgánicas, actividad de agua, agentes secuestrantes, temperatura de almacenamiento y aún el procesado mismo. Se tendrá en cuenta que todos estos elementos repercutirán sobre la estabilidad del conservador ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

En síntesis, la efectividad de un conservador puede realizarse o puede disminuir por los constituyentes activos del preparado o formulación como así también por el envase o sistema de cierre que posee, dado la posibilidad de absorción del agente conservador por parte del material del envase.

Otro aspecto a tener en cuenta es que un conservador ideal no existe ya que éste debería cumplir una serie de atributos como ser ⁽¹¹⁾:

Amplio espectro en su acción antimicrobiana

Efectivo y estable frente a diferentes pH

Químicamente estables

Compatible con diferentes componentes de una formulación

Compatibilidad con los envases

No alterar las características del producto

Poseer coeficiente de partición O/W adecuado

No tóxico en concentraciones de uso

Evitar adaptaciones de microorganismos a él

Económico

Cumplimentar con regulaciones vigentes

De los mismos, surge claramente la imposibilidad de que solo un compuesto químico pueda reunir todos esos requisitos, pues muchos son afectados por una gran parte de ellos: por lo general si posee un amplio espectro para todos los microorganismos, sería de nivel elevado, pero podrían ser tóxicos, también podrían alterar el ambiente que los contiene, plásticos por ejemplo, o ser activos solamente para determinados organismos. En este último caso puede apelarse a una combinación de agentes compatibles, que pueden complementarse y de esta forma disminuir las falencias de cada agente individual

En la Tabla I, se describen algunas propiedades generales de los principales conservadores y en la Tabla II, diversas características importantes.

Tabla I. *Propiedades generales de principales conservadores en fármacos*

Sustancias	Ejemplos	Actividad	Desventajas	Usos
Ácidos orgánicos	Benzoico Parabenos	Bacterias - Hongos	pH dependientes	Oral - tópicos
Alcohólicos	Bencilico Etilico	Amplio: bacterias - hongos	Penetración pobre en material orgánico	orales, inyectables sinérgicos
Aldehídos	Glutaraldehído Formaldehído	Elevada esporicida Bacterias - hongos - virus	Inactiva las soluciones ácidas con temperatura Tóxicos	Esterilización química de instrumental en altas concentraciones
Biguánidos	Clorhexidina PHMG	Intermedia Principalmente Gram positivos	Inactiva con material orgánico. Catiónicos	Productos oftálmicos
Halógenos	Cloro y Yodo	Elevada Bacterias.- hongos - virus	Inestables-corrosivos Inactiva materia orgánica	Usos limitados
Mercuriales	Timerosal Fenil Mercurio	Bacterias	Inactiva materia orgánica Tóxico	Oftálmicos Limitado en inyectables
Fenólicos	Cresol Clorocresol	Intermedio Bacterias. - Hongos	pH ácido disminuye irritantes	Cremas
Cuaternarios	Benzalconio Cetrimida	Baja Principalmente Gram positivos	Disminuye actividad con materia orgánica. Incompatible con aniónicos	Oftálmicos Cremas

Un aspecto que se deberá tener presente, es que no todos los agentes químicos utilizados como conservadores pueden utilizarse para cualquier producto, ya que muchos de ellos no obran por igual en cuanto a su toxicidad y compatibilidad con los productos que los utiliza. A título de ejemplo en la Tabla III se enumeran algunos agentes conservantes y su aplicación en productos comerciales. ⁽¹²⁾.

Tabla II. Características de otros conservadores utilizados en cosméticos

Compuesto	Actividad	Solubilidad	Compatibilidad	Dosis
Diazolidinil urea (Germall II)	Gram positivos y negativos	muy soluble pH 3-9	positiva con mayoría, inactiva por dilución	0.1-0.5%
Imidazolidinil Urea (Germ.115)	Menor que Germall II	muy soluble	positiva con mayoría, inactiva por dilución	0.1-0.5%
Dehidroacético	Bacterias - Mohos y levaduras	3% en etanol < 0.1% en agua	Incompatible a pH alcalino, pH óptimo: 5 - 6.5	0.002-0.5%
Dimetilodimetil Hidantoína (Glydant)	Bacterias	Soluble en agua	Inactiva por dilución, pH óptimo: 5 - 6.5	0.15- 4 %
Fenoxietanol	Bacterias Gram negativas	2.6% en agua 2% en aceite o Alcohol	Tensioactivos aniónicos, y catiónicos. Incompatible con no iónicos. pH óptimo amplio	0.5-2%
Metilcloroisotiazol-Linona-metilisotiazolinona (Catón CG)	Bacterias – Mohos - Levaduras	Agua y alcohol	Con emulsificantes Iónicos y no iónicos pH óptimo 3.5 a < 8	0.035-0.15%
Triclosan (Irgasan DP-300)	Bacterias y Hongos	Etanol Aceite	Incompatibles con no iónicos. pH óptimo 4 - 8	0.1-0.3 %
Quaternium 15 (Dowicill 200)	Bacterias Gram positivas y negativas > que Hongos	Agua - glicoles	Con emulsificantes iónicos y no iónicos pH óptimo 4-10	0-02-0.3%

Tabla III. Ejemplos de áreas de aplicación de diversos conservadores

Compuesto	Inyectables	Oftálmicos	Tópicos	Orales
Bencilico	+		+	
Benzalconio	+	+	+	
Cetrimida		+	+	
Clorobutanol	+	+		
Clorhexidina	+	+	+	
Etanol				+
Feniletanol	+		+	
Fenol	+		+	
Fenoxietanol				
Parabenos*	(+)	(+)	+	+
Tiomerosal	+	+		

*Estos compuestos, desde 2004 dieron lugar a importantes debates, dado que se le atribuían propiedades de mimetizar a sustancias estrógenas, pero hasta hoy día no existen suficientes evidencias para no permitir su empleo en las dosis que normalmente se aceptan. Se espera que un informe final sobre su seguridad, se realice en el año 2012 ⁽¹³⁾.

Efectividad de los conservadores de acuerdo a diferentes metodologías

La gran variedad de agentes químicos utilizados en la conservación de los diferentes productos si bien pueden extender la vida media de los mismos, muchas veces no alcanzan a cumplir con tal objetivo, por lo que es necesario proceder a evaluar la efectividad de la sustancia química añadida en un producto.

Para realizar tales ensayos deben tenerse en cuenta varios factores:

- 1) la metodología microbiológica a aplicar
- 2) la naturaleza de los ingredientes involucrados
- 3) el conservador añadido
- 4) el proceso de elaboración
- 5) los envases de los productos
- 6) la frecuencia de uso y
- 7) las condiciones de almacenamiento

La metodología analítica debe asegurar una recuperación de los microorganismos en forma eficiente a fin de poner de manifiesto la presencia o no de una actividad antimicrobiana adecuada por lo que se deberá demostrar la efectividad de la técnica de recuento previamente a la evaluación de la efectividad del agente antimicrobiano en la formulación ⁽¹⁴⁾.

Como fuente de guía para la realización de estos ensayos son cuatro las Organizaciones que establecieron las bases: CTFA, ASTM y USP y BP (*Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association; American Society for Testing Materials; US Pharmacopoeia; British Pharmacopoeia*, respectivamente). Dichas instituciones han desarrollado sus propias recomendaciones específicas, tanto para el ensayo en sí como para organismos de desafío utilizados, medios de cultivo y condiciones de crecimiento y almacenamiento. Requisitos que son estandarizados a fin de lograr respuestas reproducibles.

En cualquiera de esas metodologías, los resultados se interpretan luego de un período de incubación de 28 días, dejándose asentado que si bien en la mayoría de esos ensayos se utilizan microorganismos similares, no todos usan las mismas especies, como puede apreciarse en el cuadro, pero todos emplean representaciones de bacterias Gram negativas, y positivas, así como representantes de Hongos y levaduras.

En general, el ensayo debe validarse para el producto a fin de asegurar el diluyente correcto para la sobrevivencia de los microorganismos. En forma sintética consiste en inocular al producto con una misma especie o con un pool de organismos según las técnicas utilizadas. El producto se deja estar a temperatura ambiente o a temperaturas especificadas durante períodos de tiempo prefijados y hasta 28 días, examinándose para determinar los microorganismos sobrevivientes en cada tiempo señalado.

En la Tabla IV, se especifican los microorganismos sugeridos por las diversas metodologías oficiales.

Puede apreciarse que en los ensayos de Farmacopeas que son los más utilizados, prácticamente se utilizan 5 microorganismos: 3 bacterias y 2 hongos (una levadura y un hongo filamentoso) no obstante en diverso los ensayos pueden añadirse otros organismos, por ejemplo si hay una constante presencia de algún microorganismo fastidioso en algún punto del proceso productivo puede (y debería) añadirse el mismo.

Según algunas técnicas, el desafío frente a los microorganismos puede hacerse con una mezcla de varias cepas, a fin de lograr un desafío más realista; al respecto, no hay un criterio uniforme. Según algunos autores ⁽⁵⁾ las mezclas pueden presentar un mayor desafío que los cultivos simples, ya que puede haber un efecto sinérgico entre los diferentes microorganismos que podrían disminuir la efectividad del conservador. CTFA señala que puede utilizarse tanto un cultivo puro como una mezcla, en este caso podría realizarse en las fases de desarrollo de una formulación. Las Farmacopeas han armonizado la inoculación de los microorganismos por separado.

Las bacterias que se utilizan como inóculo parten de una solución madre que contenga una concentración de 1×10^8 UFC/ml que se diluye posteriormente al 1% en el producto dando en el desafío una concentración final de 1×10^6 UFC/ml/g. Con este volumen de inóculo se reduce la dilución del producto.

El tamaño del inóculo final varía ligeramente en los diferentes sistemas:

Para USP, BP, CTFA y ASTM las bacterias se hallan en la concentración anteriormente especificada y los hongos en 10^{4-5} UFC/ml/g.

Tabla IV. Microorganismos de prueba

Organismos	CTFA	ASTM	USP	BP	ATCC*
<i>E. aerogenes</i>		+			13048
<i>E. coli</i>	(+)		+		8739
<i>Proteus spp</i>	(+)				
<i>P. aeruginosa</i>	(+)	+	+		9027
<i>P. aeruginosa</i>	+			+	19429 / 15442
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	6538
<i>B.subtilis v. globigii</i>	(+)				
<i>S.epidermidis</i>	(+)				
<i>A.fumigatus</i>	(+)				
<i>A.Brasiliensis</i>		+	+	+	16404
<i>C.parapsilopsis</i>	(+)				
<i>C.albicans</i>		+	+	+	10231
<i>P.levitum</i>		+			10464

Referencias: (+): presencia con colección no especificada

* : colección equivalente

Procedimientos

CTFA ⁽¹⁵⁾: La concentración de microorganismo utilizada en el ensayo de acuerdo a lo especificado anteriormente, se añade a unos 20 g/ml de producto. Esta metodología aconseja utilizar una sola especie por muestra de producto, a fin de obtener respuestas más específicas.

Luego de la inoculación se homogeneiza adecuadamente el producto. Posteriormente se pesa una alícuota de producto o preferentemente 1 gramo se diluye en caldo 9 ml de antagonista a fin de inactivar al conservador presente. Pueden realizarse más diluciones en forma decimal. Si no se dispone de un correcto antagonista, se realiza dilución o se filtra por membrana; técnicas que permiten ayudar a la inactivación del agente y a la recuperación de los microorganismos presentes.

De las diluciones se siembra una cantidad preestablecida (0.5-1 ml) en placas de Petri y se añade el medio de cultivo con antagonista fundido y mantenido a una temperatura de unos 47° C. Las muestras inoculadas se incuban temperatura adecuada (30°- 35° C para bacterias y entre 22° a 28°C para hongos)

Las incubaciones se realizan durante diversos tiempos, (0- 1- 2- 3- 7- 14- 28 días), según la metodología y productos utilizados.

Neutralización:

Esta metodología recomienda como antagonistas caldo Lethen Lecitina y Triton X-100, o Caldo Tioglicolato; aunque lecitina más Tween 80 añadido al medio de cultivo es suficiente para una gran cantidad de conservadores.

El agente neutralizante puede incorporarse en la placa de cultivo o juntamente al medio

ASTM ⁽¹⁶⁾: Los microorganismos utilizados difieren del procedimiento anterior (Tabla IV). El método aconseja agar nutritivo para bacterias y Agar Mycophil a pH 4.7 para levaduras y hongos.

El procedimiento permite ser utilizado en dos tipos de desafío: a) con cultivos mezclados y b) con cultivos puros. El primero se efectúa con tres inóculos separados: 1) mezcla de bacterias Gram positivos, 2) mezcla de bacterias Gram negativos y 3) mezcla de levaduras y mohos. Para determinar el número de UFC el método emplea diluciones seriadas. La incubación se realiza a 32°C durante 24 h para bacterias y levaduras y a 25° C durante 72 h para mohos.

Se sugiere preparar tres muestras de 100 g en frascos de vidrio con tapas e inocular cada uno con 1 ml de suspensión señalada con anterioridad. Las muestras inoculadas se homogeneizan y dejadas a temperatura ambiente durante diversos tiempos, (0- 7- 14- 21- 28 días), a cada uno de estos periodos, 1 g de producto se mezcla con 9 ml de caldo con antagonista y efectuando otra dilución adicional a fin de realizar los recuentos de sobrevivientes correspondientes. La neutralización se realiza en forma similar que en el método anterior.

El criterio de aprobación de esta metodología requiere que las bacterias, levaduras y hongos deberían disminuir en 3 log dentro de los 7 días y no debería haber crecimiento dentro de los 28 días.

USP ⁽¹⁷⁾: Esta metodología sufrió varios cambios en los últimos años a fin de poder armonizar con las Farmacopea Europea y Japonesa.

Los organismos que se utilizan se especifican en la Tabla IV. Cultivos madres se preparan sobre TSA Agar o caldo, y Sabouraud Dextrosa agar o caldo para levaduras y hongos y se incuban a temperatura adecuada durante 24 h las bacterias, 48 h las levaduras y 1 semana los hongos. Se suspenden en solución fisiológica (9/1000 de cloruro de sodio), los hongos se suspenden en solución fisiológica más 0.05% de Tween 80. Las concentraciones de microorganismos y de esporos de hongos se ajustan a 1×10^8 UFC/ml. Las diluciones de organismos utilizados en el ensayo se especifican en la Tabla VI

Se toma 20 ml/g de producto en condiciones estériles en un frasco adecuado y estéril y se inoculan con 0.1 ml de suspensión microbiana. Se homogeneiza y dejan a temperatura entre 20 y 25° C, examinándose luego de los días 0- 7- 14- 28.

El criterio de aceptación requiere que el producto se halla adecuadamente conservado si reduce las bacterias 3 log a los 14 días según la categoría del producto. Las levaduras y Hongos deben disminuir o no modificarse en ese tiempo. (ver Tabla VII)

BP ⁽¹⁸⁾: Los organismos que se utilizan en esta metodología se especifican en la Tabla IV, no emplea *E. coli*, pero puede añadirse cuando puede representar un peligro para el preparado, por ejemplo *E. coli* ATCC 8739 o de colección equivalente, suele utilizarse para las preparaciones orales así como *Zigosaccharomyces rouxii* en los preparados orales con alta concentración de azúcar. Los cultivos madres se preparan sobre TSA agar las bacterias y en Sabouraud Agar los hongos y se incuban a temperatura adecuada durante 24 h las bacterias, 48 h las levaduras y 1 semana los hongos hasta obtener buena esporulación. Se suspenden en solución fisiológica (9/1000 de cloruro de sodio), los hongos se suspenden en solución fisiológica más 0.05% de Tween 80. Las concentraciones de microorganismos y de esporos de hongos se ajustan a 1×10^8 UFC/ml. Las diluciones de organismos utilizados en el ensayo se especifican en la Tabla VI.

Se toma 20 ml/g de producto en condiciones estériles en un frasco adecuado y estéril y se inoculan con 0.1 ml de suspensión microbiana. Se homogeneiza y dejan a temperatura entre 20 y 25° C, examinándose luego de 0- 6- 48 h y 7- 14- 28 días.

El criterio de aceptación requiere que el producto se halla adecuadamente conservado si reduce las bacterias 3 log a los 14 días. Las levaduras y mohos deben disminuir o no modificarse en ese tiempo.

El procedimiento es similar al descripto para USP, incubándose a igual temperatura y analizando una cantidad adecuada de cada uno de los contenedores luego de los tiempos establecidos.

El criterio de aceptación se basa según las zonas donde se aplican los preparados, ya sea para *productos parenterales y oftálmicos*; *Productos orales*; *Preparados tópicos* y *Preparados para oídos*, ver tabla VII.

UE (Unión Europea) ⁽¹⁹⁾: La metodología es similar a **BP**, variando ligeramente en la interpretación de resultados, ver tabla VII.

Otros procedimientos:

Dado que el tiempo final que se emplean en los métodos oficiales es de 28 días, resultaría un período muy largo para un producto en estudio, más si se tiene en cuenta que algunas veces requieren re enfrentamientos, dicho tiempo se extendería mucho más. Por tal razón algunos investigadores han propuesto métodos más cortos a fin de obviar esa dificultad. Tales métodos, llamados "Procedimientos Acelerados" son interesantes como método preliminar a fin de detectar una formulación inadecuadamente conservada; su confiabilidad y reproducibilidad lo hace recomendable para las etapas tempranas en el desarrollo de un sistema preservativo de un producto pero no intentan reemplazar a los procedimientos de Farmacopea.

Entre ellos se encuentran el **Método de Regresión Lineal de Orth** ⁽²⁰⁾ donde determina valores **D**. Este autor señala que cada organismo posee una tasa de muerte característica, y puede predecir el tiempo requerido para determinar el tiempo de desafío. El método permite medir los valores de **D** para los microorganismos de prueba en las muestras del producto, hallándose que es un método confiable para observar el tipo y concentración de conservador en productos acuosos.

Una debilidad del método es que asume una relación lineal entre el tiempo de exposición al biocida y el número de microorganismos sobrevivientes pero debe asumirse que diferentes microorganismos poseen características fisiológicas y metabólicas distintas, por lo que pueden presentar diferencias en las velocidades de muerte frente a un tratamiento letal.

El ensayo se realiza con los microorganismos especificados en USP y en las mismas condiciones, inoculando 0.1 ml de una suspensión microbiana en 50 ml de muestra. Se homogeneiza y se realiza un recuento en el tiempo inicial y luego de 2, 4, 24 y 48 h para bacterias, y 4, 8, 24 y 48 h para hongos.

Como criterio de aceptación se utiliza un **D** menor o igual a 4 para bacterias patógenas, por g ó ml, lo que indicaría que en 24 h hay una inactivación total de las mismas y un **D** menor o igual a 28 h para no patógenos, mohos y levaduras.

Otro ensayo rápido es el de **Preservación Acelerada**, que es un ensayo similar al de Orth, difiriendo solamente en que las lecturas se realizan a los 2 y 7 días para las bacterias y 2, 7 y 12 días para hongos.

Chan y Bruce ⁽²¹⁾, proponen un **Ensayo Rápido de Efectividad** que es un examen presuntivo de adaptación del estudio empleado en clínica como CIM, (concentración inhibitoria mínima). Se utilizan los mismos organismos que los especificados en USP. Los medios de cultivo y antagonistas son similares en las distintas metodologías. Se trata de establecer la capacidad del producto en prevenir el crecimiento de 10^6 organismos luego de 24 h. La transferencia se realiza con un ansa sembrando en placa de Petri conteniendo medio de cultivo con antagonista. La actividad se mide de acuerdo a una escala que va desde 0, o ausencia de desarrollo que indica gran actividad, hasta un número de colonias equivalente al 100% del control (inactividad). Se considera un valor en el borde con un 50 % de desarrollo del control. Este tipo de ensayo que puede durar aproximadamente 48 h es semicuantitativo, requiriéndose poca muestra y es rápido para evaluar un grupo grande de muestras.

Ensayos de Capacidad. Esta metodología establece la eficacia de una concentración de conservador en un producto supuestamente conservado.

Una suspensión de una mezcla de microorganismos se coloca en medios adecuados y se deja desarrollar durante 48 h. En el ensayo propuesto por Barnes y Denton ⁽²²⁾ las mezclas que utiliza son: 1) Bacterias Gram positivas, 2) Bacterias Gram negativas, 3) Bacterias esporuladas; 4) Esporas de hongos y 5) Levaduras.

El ensayo requiere que 1 ml de mezcla microbiana se añada a 20 g de producto con el conservador incorporado: las muestras se dejan a temperatura ambiente durante 48 h, posteriormente con un ansa se realizan estrías sobre medio de cultivo con el antagonista que corresponda y se incuban a 35°C las bacterias durante 24 h y a 25°C 48 hs los hongos. El ciclo se repite con re-inoculaciones durante 15 veces.

El conservador debe reducir el número de organismos viables de una inoculación unos 3 log en las 48 h para dar lugar a un resultado negativo. Esta capacidad disminuye gradualmente debido a la dilución del biocida en las reinoculaciones.

En todos los procedimientos vale recordar que la preparación del inoculo para el ensayo se realiza con un cultivo madre (stock) a través de un medio de cultivo como el TSA y/o Sabouraud. Posteriormente los organismos son subcultivados regularmente por lo general cada 4 semanas. Para el ensayo propiamente dicho, la bacteria se subcultiva durante 24 horas, mientras que el hongo *A. brasiliensis* puede requerir entre 3 a 5 días a fin de que den lugar a la formación de esporas.

Las células se suspenden en agua peptonada 1/1000 o solución fisiológica. En el caso de *A. brasiliensis*, se añade una concentración baja de Tween 80 (0.05%), facilitar la suspensión, pudiéndose además agitar con perlititas de vidrio estériles. Las suspensiones stock ser llevan a una concentración de 10^8 UFC por ml. En el ensayo se lleva a una concentración de 10^6 UFC/ml para las bacterias y de 10^{4-5} UFC para los hongos.

Si bien no existe un método simple para resolver todas las necesidades, cada fabricante deberá determinar cuál de ellos le es más adecuado, ya sea para cumplimentar con aspectos regulatorios o para obtener resultados rápidos.

Los objetivos de los ensayos es la de aportar resultados reproducibles que ayuden a determinar la calidad de un producto.

Otro hecho a tener en cuenta es que la confiabilidad de un método nuevo para determinar efectividad de un conservador de efectividad requiere de la validación del mismo. En general cualquier método debe ser validado, para asegurarnos de la confianza y exactitud que nos brinda, por otra parte es muy importante considerar la habilidad y cuidado del analista. Para ello se impone recordar en estos casos incluir

- selección apropiada del microorganismo a ensayar y su crecimiento en forma estandarizada.
- empleo de un buen sistema de recuperación de los organismos y realización de los ensayos en forma establecida y aceptable.

Empleo de antagonistas o neutralizadores

El uso de neutralizadores es para inactivar al conservador de su acción biocida. Si no fuera así la acción de este agente puede continuar en el medio de recuperación distorsionando la interpretación de los resultados.

La neutralización por lo general puede ser química, añadiendo determinados agentes inactivantes, como se señala en la Tabla V. Pero algunos biocidas son dificultosos de inactivar por ejemplo para los aldehídos (formaldehído, glutaraldehído), puede utilizarse bisulfito de sodio, pero esta sustancia también puede inhibir el crecimiento de bacterias o la germinación de esporos. Por eso es necesario de asegurarse la no toxicidad del antagonista con los microorganismos. El medio de Engley-Dey (23) propone una composición universal para la neutralización de una gran cantidad de conservadores.

Por otra parte muchos medios comerciales poseen sustancias neutralizadoras

Otros procedimientos de neutralización son mediante el empleo de medios físicos como ser la **dilución y la filtración por membrana**. Algunos conservadores son muy sensibles a la concentración y su actividad se anula por una dilución, esto es debido a que son dependientes de su **factor de concentración “n”**, que indica que cuanto más elevado es de la unidad, mayor será la influencia de una dilución en la anulación de su actividad,⁽²⁾ así por ejemplo el fenol posee un “n” de 6 lo que señalaría que una simple dilución al doble de su concentración específica de acción, su actividad disminuye 64 veces (prácticamente se anula).

La filtración por membrana resulta asimismo muy útil: las bacterias se aíslan sobre el filtro y luego se enjuagan hasta liberarlas del conservador. Posteriormente las bacterias son transferidas a un medio de cultivo a fin de efectuar el recuento correspondiente.

Tabla V. Antagonismo de Conservadores

SUSTANCIAS	AGENTES NEUTRALIZANTES
Alcoholes	Dilución-Tween 80
Aldehídos (formaldehído-glutaraldehído)	Glicina-gelatina-sulfito de sodio
Amonio cuaternario	Lecitina + lubrol * (2-lauryloxietanol); Tween 80 3%;agentes aniónicos
Benzoatos	Dilución – Tween 80
Biguánidos	Lecitina; Tween 80 3%; agentes aniónicos
Bronopol	pH alcalino; cisteína; metabisulfito sódico
Dowicide 200	Lecitina, aniónicos, no iónicos, talco, Temp.>50°C, CMC
Fenólicos	Dilución- Tween 80
Germal (2-115)	No iónicos, bentonita, Temp.>75°C,CMC
Glicoles	Dilución, Tween 80
Halógenos	Tiosulfato sódico-Tween 80
Hidrogeno peróxido	Catalasa
Kathon CG	Dilución en caldo nutritivo
Parabenos	pH >8; Tween 80
Tego	Tween 80
Triclosán	Lecitina -Tween 80

Tabla VI. Rasgos sinópticos de las diversas características. Para tener en cuenta en diferentes ensayos de desafío

Muestra a utilizar	20 g/ml
Volumen incorporado	0.01 ml de suspensión microbiana (menos del 1%)
Microorganismos usados	Bacterias, levaduras, hongos, puros o mixtos (ver metodología)
Concentración bacteriana	10 ⁶ /ml/g
Concentración de Eumycetes	10 ⁴⁻⁵ /ml/g
Medios de cultivos	Tryptona Soya Agar (TSA), Agar Sabouraud
Procedimiento de recuento	Por agar fundido en placa
Temperatura incubación	Temp.ambiente/ 30-35°C- bact. 25-30°C- eumycetes
Tiempo de incubación	24 h/ bacterias, 72 h eumycetes
Metodología utilizada	Ver Procedimientos
Soluciones neutralizantes	Ver Tabla V

Ensayos de poder biocida del neutralizante

ASTM ⁽²⁴⁾ sugiere un experimento a fin de señalar si el empleo de un agente neutralizante es efectivo y carece de toxicidad: El ensayo se realiza determinando en primer lugar en un medio de cultivo apropiado, la máxima concentración tolerada, del agente inactivador. Posteriormente se añade el microorganismo de estudio y se determina el recuento microbiano a 0 y 30 minutos.

El medio de cultivo utilizado no debe permitir un descenso microbiano significativo luego de 30 minutos.

Se añade varias concentraciones del agente neutralizante al medio de cultivo y se comparan los sobrevivientes luego de la exposición a 30 minutos. La comparación produce una concentración del agente antagonista que no disminuye la concentración de microorganismos en ese tiempo.

Se tendrá en cuenta que la seguridad por la cual se efectúa el recuento de los organismos sobrevivientes permitirá señalar la real efectividad del conservador en estudio, por lo que se deberá extremar la completa neutralización del mismo durante el plaqueo a fin de evitar una inhibición de desarrollo con el residuo del conservador.

Tabla VII: Interpretaciones de las diferentes Reglamentaciones

METODOLOGIA	BACTERIAS	HONGOS
USP Oftálmicos Tópicos Orales	3 log en 14 días 2 log en 14 días 1 log en 14 días	No aumenta en 14 y en 28 días
BP Oftálmicos Tópicos Orales	3 log en 6 h 3 log en 48 h 2 log en 7 días	2 log en 14 días 2 log en 14 días No aumenta en 14 días
UE Oftálmicos y parenterales	2 log en 6 h – 3 /24 h (1 log en 24 h -3/7 días)	2 log en 7 días (1 log en 14 días)
Tópicos	2 log en 48 h 3 log 7 días (3 log en 14 días)	2 log en 14 días (1 log en 14 días)
Orales	3 log en 14 días	1 log en 14 días
CTFA	3 log en 7 días	1 log en 7 días
ASTM	3 log en 7 días No incremento en tiempos sucesivos	Levaduras 3 log en 7 días Hongos 1 log en 28 días No incremento en tiempos sucesivos
Regresión Lineal	D < 4 h patógenos D < 28 h no patógenos	D < 28 h no patógenos
Preservación Acelerada	2-3 log en 48 h No recuperación / 7 días	No recuperación en 2-7 y 12 días

Referencias de la tabla VII: Sin paréntesis: satisfactoria./ Entre paréntesis y en itálica: satisfactoria cuando no puede hallarse la efectividad recomendada.

La interpretación de los resultados se asienta en los requisitos de los organismos reguladores ó metodologías llevadas a cabo por diferentes autores. En la Tabla VII se sintetizan los mismos. La prueba es aplicable no solamente durante el diseño de un producto sino a lo largo de la vida del mismo. Por lo común se realiza al comienzo y final de este período.

Observando la Tabla VII, puede apreciarse que las interpretaciones, de las diversas metodologías pueden homologarse si tomamos el criterio del valor D, de la Regresión Lineal, que es muy exigente, en la Tabla VIII, se señalan las equivalencias:

Tabla VIII: Relaciones de los diversos métodos con D (en horas)

Bacterias	Regresión Lineal	Preservación Acelerada	ASTM	CTFA	UE	BP	USP
Bacterias	<4	24	56	56	4	4	112
Eumycetes	<28	NC	NC	168	168	168	NC

Referencia: NC = no corresponde efectuar el cálculo.

En todos los casos los valores expuestos, equivalen en horas los valores de la Tabla VII para obtener un logaritmo de muerte, es decir D, teniendo en cuenta las exigencias más elevada en el caso de UE, BP y USP, se entiende que 56, equivale a una reducción de 3 log en 7 días; 84, a una reducción de 2 log en 7 días; 112, a una reducción de 3 log en 24 días; 168 a una reducción de 1 log en 7 días.

Se deduce muy bien que el primer método es mucho más exigente, comparado con los métodos oficiales de ASTM, CTFA y USP, con excepción de la BP y Europea para productos oftálmicos que lo son más, no obstante estos últimos son los utilizados en la mayor parte de casos en que se requiere una regulación oficial, reservándose los rápidos para acelerar determinaciones en los diseños de productos.

Bibliografía

1. Tenenbaum S. *Pseudomonads in cosmetics*, J.Soc.Cosmet.Chem.,8,797,1967
2. D'Aquino M., Rezk R., *Desinfección*, UDEBA Ed.1995
3. Wilson L.A., Ahearn D.G., *Pseudomonas-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras*. Am.J. Ofhtalmol. 84,112,1997
4. Block SS., *Disinfection Sterilization and Preservation* 4th. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia,1992
5. Cowen R.A., Steiger B., *Antimicrobial activity: a critical review of test methods of preservative efficacy*. J.Soc.Cosmet.Chem.,23, 703,1972
6. U.S.Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th.ed. 2001
7. Cowen R.A., Steiger B., *Why a preservative system must be tailored to a specific product*. Cosmet. Toilet 92(3) 15-16,1977
8. Orth D.S., Milstein S.R., *Rational development of preservative systems for cosmetic products*. Cosmet. Toilet 104:91-103,1989
9. Blomfield S.F. *Control of microbial contamination in non-sterile pharmaceuticals, cosmetics and toiletries*. In Blomfield S.F., Baird R., Leak, R.E. and Leech R.(eds) *Microbial Quality Assurance in Pharmaceuticals, Cosmetics and Toiletries*, Ellis Horwood.Chichester,pp9-14
10. Russell, A.D. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In Russell, A.D. Hugo W.B. and Ayliffe G.A. J (eds) *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. Blavckell Scientific Publications. Oxford pp 107-133
11. Norma de Castro Sira, María Luisa de Curtis de Fernández. *Preservación en Cosméticos. Pieza Clave de la Calidad*. U.C.de Venezuela. Fac. Farmacia 1997
12. Denyer S., Baird R. *Guide to Microbiological Control in Pharmaceutical*. 1990
13. D'Aquino M. *Aditivos antimicrobianos utilizados en alimentos, fármacos y cosméticos. Posibles efectos adversos*. Rev.Farm.Reviews. 153(1-2):43-58,2011
14. Sutton Scout V.W. *Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing in Cosmetic Microbiology, a practical approach*, Ed. Philip A. Geiss 2° ed. Taylor & Francis Group 2006.
15. CTFA-Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, *Microbiology Guidelines*. Curry A., McEwen (eds.) Washington D.C.
16. ASTM. American Society for Testing and Materials, in *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, 1991.
17. USP 34 ed.2011.
18. British Pharmacopeia
19. UE.Europea Pharmacopeia 3a-ed.2000
20. Orth D.S. *Linear Regression Method for rapid determination of preservative efficacy*. J. Soc. Cosmet. Chem 30:321-322.1979.
21. Chan M., Bruce H.N. *A rapid screening test for ranking preservative efficacy*. Drug Cosmet. Ind. 128:34-37, 1981
22. Barnes M., Denton G.W. *Capacity tests for the evaluation of preservatives in formulations*. Soap Perf. Cosmet. October, 729, 1969.
23. Engley F.B.Jr., Dey B.P., *A universal neutralizing medium for antimicrobial chemicals*, in Proceedings of the 56th Mid-Year Meeting of the Chemical Specialities Manufacturers Association, N.York 1970
24. ASTM *Evaluating Inactivators of Antimicrobial Agents in Disinfectant, Sanitizer and Antiseptic Products*, Philadelphia 1991, p1054.

Sección III. Instalaciones y su influencia en la calidad microbiológica de los productos.

	página
Capítulo III.1. Diseño del Laboratorio de Microbiología Carlos Luis Llorens	166
Capítulo III.2. Filtros HEPA, flujo laminar y cabinas de bioseguridad Mino Covo	178
Capítulo III.3. Aguas para Aplicaciones Farmacéuticas Carlos Chiesa	210
Capítulo III.4. Biopelículas Blanca M. Rosales y Silvia E. Rastelli	226
Capítulo III.5. Simulación del proceso de llenado aséptico o Media fill Néstor Oscar Aversa	238

Diseño del Laboratorio de Microbiología

Arq. Carlos Luis Llorens

- *Preparar la necesidad*
- *Comienzo del diseño*
- *Guion de Microbiología*
- *El anteproyecto*
- *Medidas y formas*
- *El proyecto*
- *Tipos de mobiliarios*
- *Materiales para muebles*
- *Complemento*

1. Preparar la necesidad

Antes de comenzar con un diseño, o distribución de espacios, con o sin asistencia de un arquitecto, es necesario crear el Requerimiento de Usuario (URS) al respecto. Ese URS entre los distintos capítulos, deberá incluir lo mínimo necesario que el diseñador necesita para preparar el Plan de Necesidades.

Lo básico que el diseñador necesita es:

- Descripción del destino de la actividad
- Si forma parte de un complejo industrial, universitario, de investigación, etc.
- Descripción de las distintas tareas que se desarrollarán en el laboratorio.
- Flujograma de esa actividad.
- Nómina de los locales.
- En cada local, equipamiento relevante que esté apoyado en el piso y que esté apoyado en forma permanente sobre mesadas.
- Cantidad de personal involucrado, con discriminación de actividad y sexo.

Con esta información, el diseñador podrá dimensionar los distintos locales, obtener la superficie de cada ambiente, calificar las distintas zonas en su condición higiénica y agregar lo necesario para que la actividad pueda desarrollarse con las condiciones ambientales adecuadas. También podrá evaluar las instalaciones complementarias para su funcionamiento, que podrán ser dependientes de otro conjunto de servicios de donde se podrá vincular.

El Plan de Necesidades (PN) es una planilla de datos ordenadora, que permitirá obtener las superficies totales del emprendimiento con sus distintas condiciones. Se podrá darle valor a cada condición y estimar antes del comienzo del diseño el costo del mismo. (Ver Tabla 1)

Tabla 1: Plan de necesidades

Sector	Nº	Local	Destino	Zona ISO	Medidas			Superficie	Equipos relevantes	Observaciones
					Largo	Ancho	Alto			
AREA GENERAL	GE.01	Acceso	Entrada de personal	NC	4,00	2,60	2,60	10,40	Mostrador	
	GE.02	Vestuario Hombres	Cambio de ropa de calle	NC	3,00	4,00	2,60	12,00	18 lockers	
	GE.03	SS Hombres		NC	2,60	3,00	2,60	7,80	2 inodoros 1 mingitorio 2 lavabos	
	GE.04	Vestuario Mujeres	Cambio de ropa de calle	NC	3,80	4,00	2,60	15,20	24 lockers	
	GE.05	SS Mujeres		NC	2,60	3,20	2,60	8,32	3 inodoros 3 lavabos	
	GE.06	Ropería	Guarda de mudas	NC	2,00	3,00	2,60	6,00	4 módulos estanterías 0,9 x 0,45 + 1 mesada de 1,40 m	
	GE.07	Gerencia	Gerente de CC	NC	3,60	3,40	2,60	12,24	1 puesto trabajo clase A	
	GE.08	Biblioteca	Sala de consulta y de reuniones	9	4,00	3,60	2,60	14,40	Biblioteca. Mesa para 6 personas	
	GE.09	Circulación CC	Vincula Labs.	NC	6,00	1,80	2,60	10,80		
									97,16	
LABORATORIO FQ	FQ.01	Balanzas No Segregadas	Pesada de materias no segregadas	9	2,40	2,00	2,60	4,80	2 balanzas y 1 Karl Fischer	
	FQ.02	Balanzas Segregados.	Pesada de materias segregadas, como citos, hormonas compatibles, etc	8	3,20	2,40	2,60	7,68	1 campana de 1,50, Cabina de Bioseguridad B2, mesada, mesita rodante, 3 balanzas	
	FQ.03	Vestidor Pesadas Segregados	Vestidor	9/8	2,00	1,40	2,60	2,80	Banco transferencia	
	FQ.03	Cromatógrafo gaseoso		9	2,00	2,40	2,60	4,80	1 cromatógrafo, 1 PC, mesada de apoyo	Se ubicará tubos de Hidrógeno o generador de H.
	FQ.04	Instrumentos FQ	Sector o sala para ubicar los instrumentos o aparatos sensibles.	9	4,00	5,60	3,00	22,40	Mesadas, 5 HPLCs, 4 Pcs, 1 Polarímetro, 1 Espectrofotómetro UV, 1 IR	Iluminación regulable, poca luz natural, inyección aire limpio.
	FQ.05	Disolutores		9	2,90	3,00	3,00	8,70	2 disolutores, 1 piletta 1 mesada	Iluminación antiactínica
	FQ.06	Laboratorio General FQ		9	10,00	4,00	3,00	40,00	Sala general con mesadas, muebles, campanas, heladeras, freezer, tituladora y PC, caja de revelado, droguero, seguridad, etc	Iluminación antiactínica
	FQ.07	Depósito de Insumos FQ.	Guarda de insumos del área	9	2,50	2,00	2,60	5,00	Estanterías perimetrales	Iluminación antiactínica
	FQ.08	Lavadero FQ	Lavadero de vidrios y utensilios	9	2,90	4,00	2,60	11,60	Mesadas, piletas, lavadora y estufa de secado	
	FQ.09	Oficina Jefe FQ		9	3,80	3,20	2,60	12,16	1 puesto de trabajo	Vista al FQ.06
	FQ.10	Oficina Asistente CC		9	3,00	2,50	2,60	7,50	1 puesto de trabajo abierto	
	FQ.11	Oficina Supervisor CC		9	2,60	3,00	2,60	7,80	1 puesto de trabajo clase B	Muy vinculado al FQ.06
	FQ.12	Oficina Asistente CC Tec	Asistente técnico	9	2,60	3,00	2,60	7,80	1 puesto de trabajo, semi abierta clase C	
FQ.13	Oficina Checker's	Ubicación de 4 checker's	9	5,00	4,00	2,60	20,00	4 puestos de trabajo semi abierto clase C. Armario de 2 puertas para elementos		

En el PN, deberá indicar alguna característica particular (además de las ISO) que debe tener el ambiente, que condiciona el diseño, como porcentajes bajos de humedad, anti explosividad, anti vibraciones, acústica, etc.

Conociendo la cantidad de analistas, se puede obtener medidas de aproximación, que más adelante se deben corroborar con la actividad analizada en detalle.

A continuación se detallan las superficies y medidas que pueden usarse para una aproximación (Ejemplos para poblaciones totales mayores a 20 personas):

• Vestuario con sanitario	1,60 m ² por persona
• Vestuario sin sanitario	1,00 m ² por persona
• Mesada de trabajo por cada operador	3,00 m de largo de mesada (promedio)
• Superficie global del laboratorio sin Sala de Máquinas)	9,00 m ² por analista (todo incluido)
• Salón Microbiología	8,00 m ² por analista
• Preparación de Medios	8,00 m ² por persona
• Lavadero	8,50 m ² por persona
• Pesadas y entorno	1,40 m ² por mesa
• Control de Esterilidad completo con esclusas	12,50 m ² en adelante
• Control higiénico completo con esclusa	10,00 m ² en adelante
• Sala de estabilidad	2,20 m ² por cada equipo de 1 m ²
• Equipo y entorno por cada CBS de 1,20 m	7,00 m ² por equipo
• Equipo y entorno por cada CBS de 1,50 m	8,00 m ² por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,20 m	2,50 m ² por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,50 m	3,10 m ² por equipo
• Equipo y entorno por cada campana de 1,80 m	3,70 m ² por equipo
• HPLCs y entorno	1,50 m ² por equipo
• Sala de reuniones / entrenamiento	1,60 m ² por persona (a partir de 6)
• Oficina Gerente	12,00 m ²
• Oficina Jefe	9,00 m ²
• Oficina abierta	4,50 m ² por persona
• Depósito de muestras y archivos	3,00 m ² por cada 100 cajas de 0,45 x 0,30x 0,15 m
• Sala de Máquinas para HVAC, PW, Vacío, Aire comprimido, gases, electricidad, etc.	25 % de la superficie global
• Espesores de paredes, escaleras y conductos	8 % de la superficie global

Como ejemplo, un laboratorio de microbiología donde trabajen 20 personas podrá requerir de 240 m² aproximadamente, incluyendo todo. Si el laboratorio forma parte de un edificio con otras actividades, la superficie se reduce proporcionalmente a lo compartido.

2. Comienzo del diseño

La distribución general es relativa en función del lugar que se implante. Sin embargo hay distribuciones que siempre terminan en buenos resultados. El Laboratorio de Microbiología en general es parte del complejo Control de Calidad. Como está visto en el ejemplo presentado en el Plan de Necesidades, Microbiología ocupa un 25 %. En los esquemas los “globos” tienen las superficies proporcionadas al porcentaje. (ver Figuras 1 y 2) Pueden lograrse distintas alternativas de relación de los distintos sectores.

Se observa que siempre es conveniente que la circulación principal divida de un lado los Laboratorios y del otro las Áreas Generales. El Área Técnica está en un ejemplo en línea punteada que significa que está por encima. En la otra ilustración está en el mismo nivel.

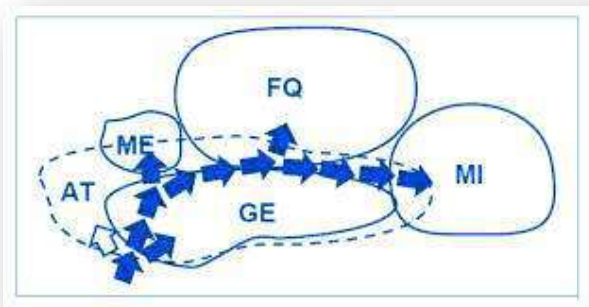


Figura 1 – Distribución 1

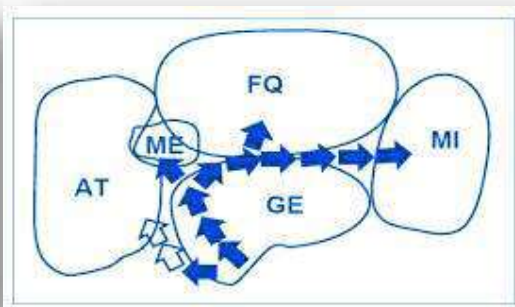


Figura 2 – Distribución 2

3. Guion de Microbiología

Es la primera imagen gráfica que puede demostrar una interrelación entre sectores. Con un concepto similar se distribuyen los locales del Laboratorio de Microbiología dentro del contexto de la distribución general seleccionada. (ver Figura 3) Podrán necesitarse diferenciación de locales del mismo destino en caso de preparar o analizar segregados.

El control higiénico (o control de materiales no estériles) podrá realizarse en ambientes de condición ISO 9, bajo un flujo laminar, que no precisa de un vestidor previo. Sin embargo considero que debe realizarse en sala separada con presión negativa. Aun así, al nivelarse presiones al abrirse la puerta se podrían correr riesgos. Para limitarlos es conveniente una esclusa vestidor de acceso, que además daría la ventaja de introducir una mejora de calificación higiénica.

Se podrán encontrar múltiples variantes, con ventajas entre una y otras. Se deberá verificar las interrelaciones funcionales, marcando los flujos principales de personas en sus distintos estados de vestimenta por condición higiénica, de materiales y muestras y de residuos. (ver Figura 4).

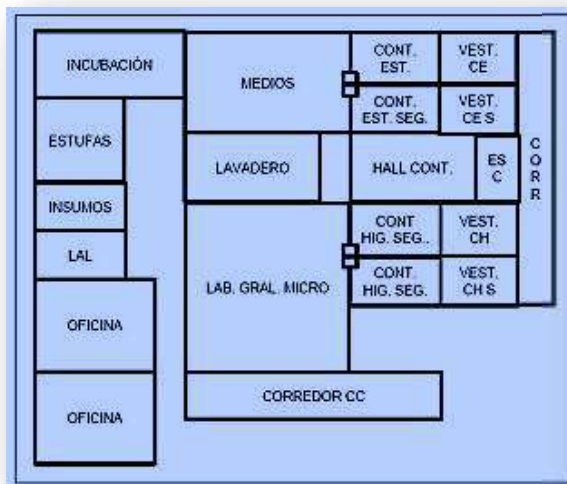


Figura 3 – Laboratorio de Microbiología

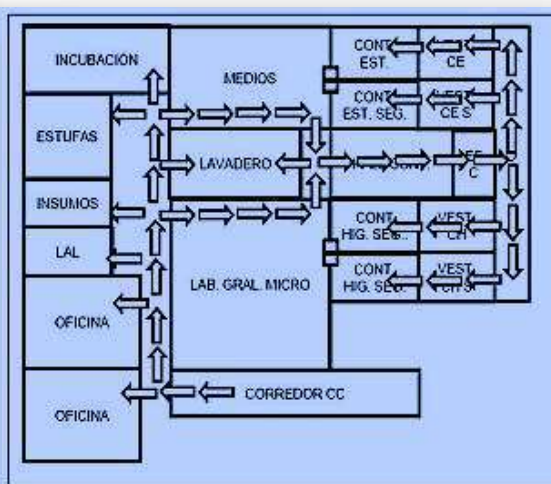


Figura 4 – Flujos del Laboratorio

Los locales que deben estar vinculados en forma directa son:

- Laboratorio General de Microbiología con Control Higiénico vía *pass throughs*
- Medios con Control de Esterilidad vía *pass throughs*

- Lavadero con Laboratorio General de Microbiología y Medios
- Laboratorio General de Microbiología con Medios
- Los vestidores encadenados para ingreso a Control Higiénico y a Control de Esterilidad

Se deberá considerar que los locales de Control Clase ISO 7 o 5, deben tener ventanas hacia algún sector para que el personal pueda ser vigilado y asistido en caso de necesidad.

Se deberán incluir los vestidores esclusas entre cada cambio de condición higiénica o en otras circunstancias como en los casos de protección del entorno.

Los vestidores deberán tener un banco de transferencia, para delimitar los sectores protegidos. Se deberá impedir el paso de rodantes entre una clase y otra.

La esclusa vestidor como el *pass through* es una frontera, como también lo es autoclaves, estufas y cámaras de descontaminación de dos puertas.

Las puertas de las fronteras deberán estar enclavadas, para no permitir aperturas simultáneas. En las autoclaves, estufas y cámaras, como también duchas descontaminantes el tiempo de permanencia es fundamental.

Como todo traspaso requiere cambios de ropa, preparación de los materiales o permanencia, se deben estimar los tiempos para un cálculo de efectividad de tareas. Por ello se debe seleccionar adecuadamente la vestimenta, calzado y coberturas, para que estén balanceados en tiempos, costos, comodidad y eficacia. No hay un patrón común, sino que cada laboratorio tiene características particulares que pueden condicionar la selección de ropas o marcar procedimientos, que podrán recabar de una solución arquitectónica distinta.

Durante el Guion, se deberá prever, las entradas de equipos voluminosos y en qué etapa de obra se producirá, como también su reemplazo o retiro para reparación.

La utilización de aisladores condiciona el diseño. Bien sabido es que la operación realizada aislada del medio que la rodea, cuanto más pequeño sea el lugar contenido, es más segura para el medio ambiente, el operario y el material trabajado. Se anulan esclusas vestidores, *pass throughs* y se reducen las filtraciones y volúmenes de aire acondicionado.

Los costos de los aisladores son en muchos casos más convenientes que superficies y volúmenes construidos, más ropas y tiempos empleados en preparación y validación de áreas.

Determinar el uso de aisladores se deberá tomar al inicio del proyecto, siendo mucho mejor que sea impuesto en el URS.

Durante el desarrollo del Guion se indicará al diseñador, alguna característica particular del equipamiento que requiera atención particular, como utilización de reactivos disolventes de PVC, o ácidos, que puedan afectar superficies, durante las operaciones. Requieren especial atención condiciones de corrientes de aire y vibraciones para balanzas, olor en alguna preparación, calor localizado, humos, gases, pisos conductivos o no, luz antiactínica, obtención de penumbra, luz natural, encandilamiento, destellos, ruidos o silbidos de centrifugas, etc.

Esas condiciones y otras propias de la seguridad, como vías de escape, duchas, lavajos, alarmas, antirrobo y antivandalismo, serán discutidas en su alcance en esta etapa de diseño.

4. El Anteproyecto

El anteproyecto, es un borrador del proyecto final. Es un anticipo, la base que una vez aprobada sirve para desarrollar todos los documentos que integran el proyecto.

En esta etapa, se definen las puertas, ventanas, distribución de los muebles, materiales de construcción y terminación, y necesidades de los servicios. Para ello, se utiliza una Planilla de Ambientes y Terminaciones (PAT), que se confecciona extrayendo los datos del PN y del Guión precedente agregando ahora instalaciones y terminaciones. (Ver Figuras 5, 6, 7 y 8) La planilla se confecciona en una sola lámina que involucra todas las instalaciones. En las figuras están separadas por comodidad de la presente publicación.

Como observamos en la Planilla de Ambientes de HVAC, se seleccionan locales con la presión definida, creando

los flujos correspondientes. Entre cada salto higiénico se deben prever 12,5 pascales. Es normal tomar 15 pascales para no estar en el límite

PLANILLA DE TERMINACIONES																											
Sector	N°	Local	CONTRAPISOS				MUROS				PISOS		ZÓCALOS	REVOQUES	REVEST	CIE											
			ALUSADO IMPERMEABLE BAUTERA DE VAPOR COBRE 10/10	COBRE 10/10	COBRE 10/10	OTROS	LAJILLO COMÚN	LAJILLO COMÚN 10/10	LAJILLO HIGIÉNICO PORTANTE	CARTÓN VISO COMÚN	CARTÓN VISO ANTIBACTERIAL	PLACA CEMENTICIA	OTROS	PORTAFRÍOS 3mm	GRES CERAM. 20 x 20	GRES CERAM. ANTIDESLIZANTE 20 x 20	VIVILCO SOLDADO	OTROS	VISO REFORZADO	INTERPELABLE GRUESO Y FINO	GRUESO BAJO REVESTIMIENTO	OTROS	VIVILCO EN ROLLO SOLDADO	CERAMICO 20x20	OTROS	Cambio de piso control ambiental	
CONTROL DE CALIDAD	LABORATORIO FQ	FQ.13 Oficina Chequera	X	X	X		X	X				X	X	R		X	X			X	X		X				
		FQ.14 Archivo CC	X	X	X		X						X	X	R		X			X			X				
		FQ.15 Contramuestras	X	X	X		X	X				X	X	R		X			X			X					
	MICROBIOLOGÍA	MI.01 Laboratorio General Mic.	X	X	X		X	X				X	X	R	X					X			X				X
		MI.02 Insumos Mic.	X	X	X		X	X				X	X	R	X					X			X				
		MI.03 LAL	X	X	X		X	X				X	X	R	X					X							
		MI.04 Preparación de Medios y Esterilización	X	X	X			X				X	X	R	X					X			X				
		MI.05 Lavadero Mic.	X	X	X		X		X			X	X	R	X					X			X				
		MI.06 Control de Esterilidad	X	X	X			X				X	X	S	X					X			X				
		MI.07 Control de Esterilidad segregados	X	X	X			X				X	X	S	X					X			X				
		MI.08 Hall Control Esterilidad	X	X	X			X				X	X	S	X					X			X				
		MI.09 Vestidor CE	X	X	X			X				X	X	S	X					X			X				
MI.10 Escucha a Vestidor CE		X	X	X		X	X				X	X	S	X					X			X					
MI.11 Control Higiénico		X	X	X		X	X				X	X	S	X					X			X					

Figura 5 – Terminaciones - Figura 6 – HVAC

PLANILLA DE AMBIENTES - HVAC																	
Sector	N°	Local	Zona ISO	Presión - Pa	Temperatura ambiente	Humedad %	Tempo		Filtr. %	Filt. Tipo/med. anual	OTA %	MOP	VE	Temperatura ambiente			(Observar)
							min	max						min	max	max	
LAB. MICROBIOLOGÍA	MI.01	Laboratorio General Mic.	1	+0	+15	30	20+1	20+1	99+1		MI.01	1				20	
	MI.02	Insumos Mic.	1	+0	+15	30	20+1	20+1	99+1		MI.01						
	MI.03	LAL	1	+0	+15	30	20+1	20+1	99+1		MI.01	1				10	
	MI.04	Preparación de Medios y Esterilización	1	+0	+15	30	20+1	20+1	99+1		MI.01	1				30	10
	MI.05	Lavadero Mic.	1	+0	+15	30	20+1	20+1	99+1		MI.01	1				10	
	MI.06	Control de Esterilidad	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					(Nivel 1)
	MI.07	Control de Esterilidad segregados	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.03	1					(Nivel 1)
	MI.08	Hall Control Esterilidad	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.09	Vestidor CE	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.10	Escucha a Vestidor CE	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.11	Control Higiénico	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.12	Control de Higienización segregados	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.03	1					
	MI.13	Hall Control Higiénico	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.14	Vestidor CH	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					
	MI.15	Escucha a Vestidor CH	1	+0	+15	30	20+2	20+2	99+1	H14	MI.02	1					

PLANILLA DE AMBIENTES - ELECTRICIDAD

Sector	N°	Local	Datos de equipamiento instalado										Suministros de el local									
			Equipo	Marca	Modelo	Serie	Modelo agua calentador	Clasificación en Massanilla	Amplificación energética	Amplificación luz	Amplificación (V)	Toma 220V campo de servicios externos	Toma 220V lavadero interno	Boiler de F.M.	Amplificación estacionaria	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero	Amplificación en lavadero
LAB. MICROBIOLOGIA	01.01	Laboratorio General Mic.	(1)				AS	(1)			500-200	2	14	2	30	1	2	1	1	1	1	1
	01.02	Insumos Mic.									500	1	2									
	01.03	LAL	(2)	(2)			12	2			500	2	4	1	2		1	1	1	1	1	1
	01.04	Preparación de Medios y Esterilización	(3)				5				500-200	2	8	2	15	1	1	1	1	1	1	1
	01.05	Lavadero Mic.	(4)	(4)	(4)		12				500	1	8	1	2		1	1	1	1	1	1
	01.06	Control de Calidad	(5)	(5)	(5)		8	1			750-200	2	2			1	1	1	1	1	1	1
	01.07	Control de Esterilidad reproductores	(6)	(6)	(6)		8	1			750-200	2	2			1	1	1	1	1	1	1
	01.08	Hall Control Esterilidad									500	1										
	01.09	Verdadero CE									500											
	01.10	Esterilización Verdadero CE									500											
	01.11	Control Higiénico	(7)	(7)	(7)		5				500-200	1	2	2		1	1	1	1	1	1	1
	01.12	Control de Higiénico reproductores	(8)	(8)	(8)		6				500-200	1	2	2		1	1	1	1	1	1	1
	01.13	Hall Control Higiénico									500	1										
	01.14	Verdadero CH									500											
	01.15	Esterilización Verdadero CH									500											
	01.16	Inoculación	(9)	(9)	(9)	(9)	14	(9)	1		500	1	2	2	8		4	4				
	01.17	Oficina Resp. Mic.									500	1	4	2								
	01.18	Oficina Mic.									500	1	4	2								
	01.19	Esterilización Mic.	(10)	(10)	(10)						500	1	4	2								

Figura 7: Electricidad - . Figura 8: Sanitaria y especiales

PLANILLA DE AMBIENTES - SANITARIA Y ESPECIALES

Sector	N°	Local	Espec. a ambiente	Cantidad (Lts)	Horas en Func.	Presión en bar	Suministros sanitarios										Suministros especiales											
							Agua Potable Fra.	Agua Potable Caliente	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro	Presión de suministro
LAB. MICROBIOLOGIA	01.01	Laboratorio General Mic.	A	(1)	(1)		10	8	4	4	10	8	4	4	10	8	4	4	10	8	4	4	10	8	4	4	10	8
	01.02	Insumos Mic.		(1)	(1)																							
	01.03	LAL	A	(1)	(1)		2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
	01.04	Preparación de Medios y Esterilización	A	(1)	(1)		6	4	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	01.05	Lavadero Mic.	A	(2)	(2)	(1)	5	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	01.06	Control de Calidad	A																									
	01.07	Control de Esterilidad reproductores	A																									
	01.08	Hall Control Esterilidad																										
	01.09	Verdadero CE																										
	01.10	Esterilización Verdadero CE	A				1		1																			
	01.11	Control Higiénico	A				1		1																			
	01.12	Control de Higiénico reproductores	A				1		1																			
	01.13	Hall Control Higiénico																										
	01.14	Verdadero CH																										
	01.15	Esterilización Verdadero CH	A				1		1																			
	01.16	Inoculación	A	(5)	(5)		4		4																			
	01.17	Oficina Resp. Mic.																										
	01.18	Oficina Mic.																										
	01.19	Esterilización Mic.	A	(3)	(3)		4		4																			

En la Figura 8, los números indican la cantidad de puntos de uso. Las características de las terminaciones, deben responder a evitar el acumulamiento de suciedad, que sea fácilmente limpiable y lavable. Por tal razón es aconsejable que no existan ángulos rectos entre paramentos en sí, éstos con el ciellorraso y con el piso. También las carpinterías y los vidriados, por la misma razón, es preferible que estén enrasados. Estas medidas son bien venidas en clase ISO 9, aconsejables en ISO 8 y obligatorias en ISO 7 y 5.

Trabajar con las medidas y formas de los ambientes es de la etapa de anteproyecto. Para ello utilizamos el Plan de Necesidades preparado.

Una sala de más de 30 m², con una proporción de ancho/largo entre 1/1 y 1/1,5 debe tener una altura de 3 m.
Una sala menor puede tener 2,40 a 2,70 m de alto según la función.

Los muebles de laboratorio de producción estándar están modulados. Habitualmente las medidas de ancho de frente son 60 cm. Se usan submódulos de 15 cm para ajustes (Ver Figura 9) La profundidad de las mesadas y campanas que se usan (Ver Figura 10) son:

- Para uso común de apoyo y equipos pequeños: 60 cm
- Para uso general, con o sin pletas: 75 cm
- Para apoyo de equipos grandes o profundos: 90 cm
- Campanas y cabinas de bioseguridad 90 cm

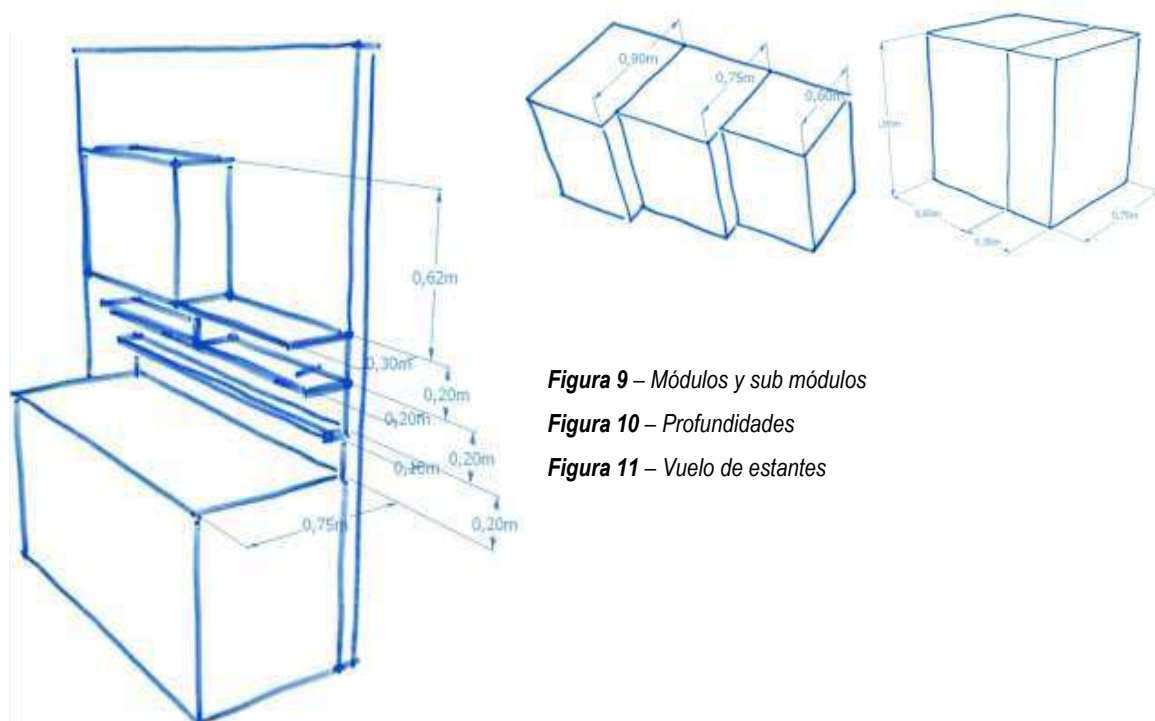


Figura 9 – Módulos y sub módulos

Figura 10 – Profundidades

Figura 11 – Vuelo de estantes

Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos

vuelo será hasta 20 cm y desde 45 cm de la mesada y hasta 1,80 m del piso, el vuelo no debe sobrepasar 30 cm. (Ver Figura 11)

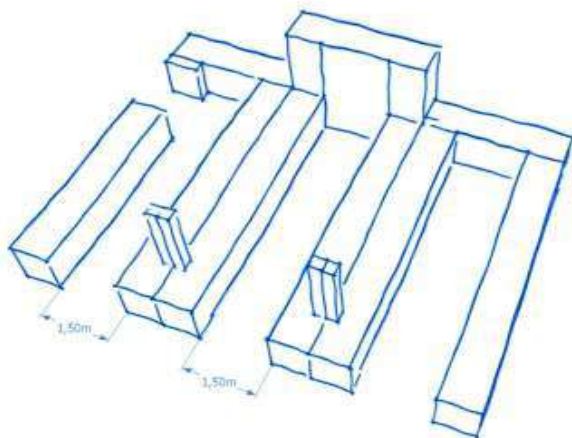
Las mesadas se pueden disponer de diferentes maneras; perimetrales, en forma de penínsulas o en islas.

Cada una tiene sus ventajas y desventajas. En general el aprovechamiento del espacio es mayor usando una combinación de perimetrales y penínsulas.

Como comodidad de trabajo, la forma de península es buena. Mejor aún es la forma de isla. En ambas los analistas no trabajan frente a una pared.

Se busca generalmente que las actividades de poca asistencia de personal, se ubiquen hacia el fondo de la península y alejadas de las puertas y ventanas.

Figura 12 – Distribución



Las esquinas de los locales, con mesadas perimetrales crean espacios poco prácticos. Más si las mesadas son profundas. Se debe tratar de no tener esquinas encontradas de mesadas. La solución que optimiza el uso del mueble inferior, la mesada y los estantes superiores, es cortar una de las mesadas concurrentes 90 cm antes del encuentro. (Ver Figura 11)

Cuando las esquinas están ocupadas con muebles, terminan siendo ocupadas por equipos de muy poco uso, obsoletos y descartes de infinidad de materiales. Es dificultosa la limpieza y por esa razón termina discontinuándose.

En general las mesadas perpendiculares al aventanamiento reciben mejor iluminación natural. Las mesadas en paralelo a las ventanas arrojan sombra entre ellas y el personal puede tener deslumbramiento.

Se debe tener la precaución de ubicar convenientemente los equipos que necesitan atención especial, como el service, conexiones múltiples muy seguidas, desagües, ventilaciones, etc. También aquellos que necesitan condiciones particulares como, protecciones ante vibraciones, luz excesiva, temperatura estable, corrientes de aire, aislaciones acústicas o térmicas, etc.

Las separaciones entre mesadas enfrentadas deben ser superiores a 1,50 metros. Cuando una mesada está enfrentada con una pared, se podrá reducir a 1,20 metros. Cuando se enfrentan a muebles altos, dependerá del tipo de mueble, si es de hojas de abrir, será la suma de la hoja abierta más saliente con 0,90 metros. Ejemplo; hoja abierta de 0,60 m + 0,90 m = pasillo de 1,50 metros.

Las separaciones en cabecera son similares, aunque puede reducirse si no hay analistas que trabajan de frente en cabeceras. Medida mínima de paso de 1 persona; 0,90 m, para 2 personas 1,20 metros.

6. El proyecto

La etapa de proyecto es de desarrollo. Se plasma en documentos; planos y pliegos toda la intencionalidad. Se determinan en detalle las medidas de las salas, los muebles, los equipos fijos, y los móviles de gran tamaño.

El continente del laboratorio, con su estructura, muros y tabiques, cielorrasos, pisos y revestimientos, puertas, ventanas y vidrios, instalaciones de todo, es desarrollado a detalle para que pueda ser construido y probado.

Las salas de condición higiénica ISO 9, 8, 7 y 5 como sus instalaciones de servicio de aire acondicionado, aguas purificadas, aire comprimido, gases, electricidad, etc. deberán aceptar las certificaciones correspondientes a DQ, IQ y OQ.

La definición temprana del vuelco del efluente, condiciona diseño, procedimientos y respuestas adecuadas.

Las condiciones de seguridad ante incendio y explosiones, sean constructivas o funcionales serán atendidas con muros cortafuego, exutores, hidrantes, rociadores, extinguidores, mantas, alarmas, duchas, lavajos, protección ante derrames y lo necesario para la contención. Las vías de escape serán analizadas e implementadas en esta etapa. La protección al medio ambiente por derrames, vuelcos, expulsiones de gases, aires contraminados, olores, etc. es fundamental que sea considerado y dada la respuesta conveniente.

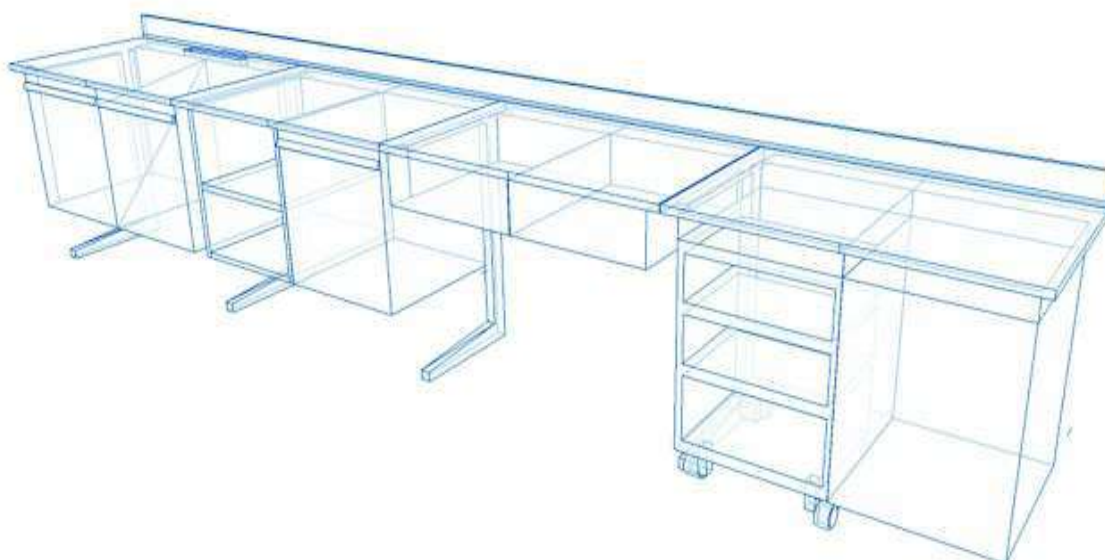
Terminado el proyecto, la construcción deberá desarrollarse sin alterar estas premisas.

7. Tipos de mobiliarios

A considerar el mobiliario, se prestará atención al tipo de sostén. Hay sistemas de muebles bajo mesada apoyados en patas, apoyados sobre banquinas, colgados de las mesadas o rodantes. Quizá los más ventajosos son los rodantes, por su facilidad de componerlos a gusto del usuario y prácticos al momento de limpieza y atención de servicios.

Los suspendidos de las mesadas, tienen la ventaja de dejar el piso libre para la más fácil limpieza. Los peores son los apoyados en banquinas, por su poca practicidad para modificaciones.

Figura 13 – Tipo de sostén



Las mesadas se sostienen de diferentes formas; apoyada en el mueble bajo, apoyada en patas rectas, en ménsulas tomadas de la pared ó en estructura de pies con columna contra la pared integrada con una ménsula. Según el esquema de mueble bajo preferido se selecciona el sostén de mesada. La combinación de provisión comercial más acertada es rodantes y ménsulas. En esta combinación el espacio bajo mesadas es libre y acepta variadas combinaciones, aún con el laboratorio en funcionamiento. (Ver Figura 13)

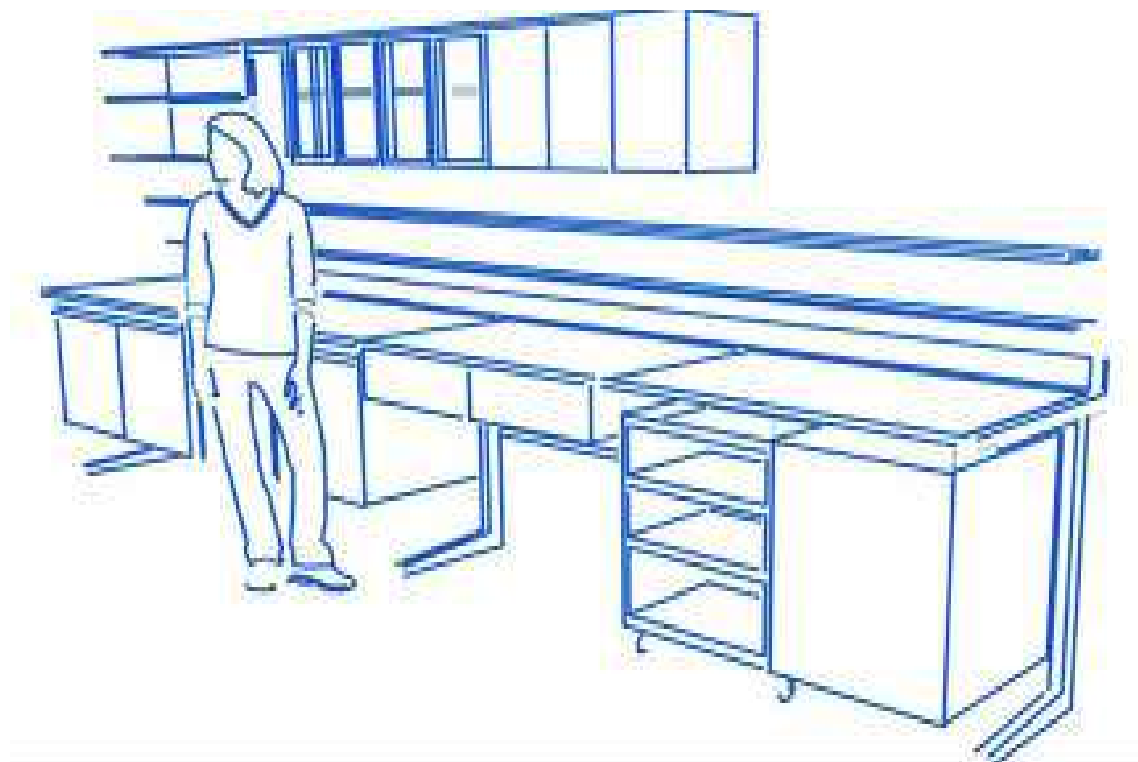
Los estantes y alacenas sobre mesada, en la generalidad son sostenidos de las paredes. En caso de islas, se sostienen entre las columnas de los servicios. En casos particulares se pueden colgar del techo. Esta última condición se debe decidir antes de la construcción de los cielorrasos.

Los muebles altos apoyados al piso, en algún caso podrán tener ruedas, que los hacen ventajosos por similares motivos a los apuntados. Existen muebles particulares por la función, como campanas, cabinas, archivos ignífugos, antiexplosivos, especiales para guardar corrosivos o solventes, deslizables para vidrios, antivibratorios para balanzas, guarda de elementos de seguridad, etc. No solamente los metros lineales de mesadas se tomarán en cuenta a la hora de definir superficies, sino también la variedad y cantidad de estos muebles.

Otro tema, son los equipos apoyados al piso que debemos considerar; heladeras, freezers, cámaras de estabilidad, estufas, autoclaves, carros, lavadoras, centrífugas importantes, etc.

Definir la arquitectura con distribución, tipo muebles y sostenes de mesadas, permitirá definir la distribución de servicios; si es espaldar sobre la pared bajo mesada, o sobre ella, o por cielorraso con bajadas encolumnadas o por racks suspendidos. Todas son prácticas. Lo ideal es que no sean embutidas en paredes o tabiques, ya que le restan flexibilidad a los cambios o de molestas reparaciones. (Ver Figura 14).

Figura 14 – Mobiliario terminado



8. Materiales para muebles

Existe mucha variedad de materiales para la construcción de muebles y sus terminaciones superficiales. Es bueno definir la calidad apropiada de terminación para cada sector del laboratorio, ya que los costos son muy dispares. Seleccionar lo mejor y que sea similar para todo es derrochar recursos.

Tanto los muebles de madera (reconstituida) o metálicos son aptos porque existen terminaciones superficiales para satisfacer la necesidad de uso y proteger su estructura. Es importante que todos los herrajes sean de muy buena calidad y que acepten una limpieza con los agentes habituales sin degradarse.

Las terminaciones para frentes de puertas (exterior o interior) más aptos son; vinílicos, melamínicos, pinturas horneadas, poliuretánicas o epoxis. Los estantes, salvo las necesidades especiales pueden tener las mismas superficies. El acero inoxidable también es conveniente aunque más costoso.

Las mesadas pueden construirse según el uso exigido. Hay de melamina de distintas condiciones de resistencia, de resinas, de cerámica, de inoxidable, vitrificadas, etc. La variedad es amplia. Es habitual que se coloquen distintas mesadas, según la actividad.

Una forma de definir si las superficies de contacto son aptas para las actividades a que van a ser sometidas es experimentar muestras de materiales a los agentes más cáusticos, calor y cortes mecánicos.

Para la construcción de obra y muebles no existen materiales y mano de obra perfectos.

9. Complemento

Durante el proyecto y la construcción se deben considerar otros temas que influyen. He aquí una lista de ejemplos:

- Ubicación de los tubos de gases especiales, cercano a los puntos de uso y con manifold operable desde el laboratorio.
- Retiro de residuos, seleccionados según disposición final. Es muy práctico una esclusa al exterior, con *pass through* especiales para residuos.
- Depósito e ingreso de corrosivos y solventes, seguro, con antiderrame y cuba según cantidad acopiado. El consumo diario podrá estar dentro de muebles especiales.
- Control de fuego. Cercar las áreas críticas con tabiques cortallama y dampers cortafuego de conductos. El cierre de tabiques debe ser hasta la losa de hormigón o sobrepasar el techo metálico en medidas reglamentarias.
- En laboratorios de segregados y de bioseguridad, mantener permanentemente los flujos y presiones de aire. Cambio de filtros con sistema *bag-in bag-out*.
- Vías de escape. Tener la posibilidad de salida por extremos opuestos a vías seguras o al exterior.
- Lavaojos y duchas de emergencia. Instalados en lugares adecuados. Las duchas hacia los lugares de escape. Permanente control del agua de la cañería de lavaojos, colocando un servicio posterior de uso regular.
- Tener un lugar con los elementos de seguridad internos definido y señalizado.
- Vuelco contaminado. Crear un sistema de colección seguro con alarma de colmatación y fácilmente removible.
- En caso de utilización de materiales inflamables y/o explosivos, adecuar el diseño a protección del personal y libre vía de deflagración.
- En laboratorios de bioseguridad, implementar la escala de contención en forma segura y el control de los desechos.
- Cuidado del medio ambiente. Con filtrado y/o lavado de expulsiones de campanas o cabinas de bioseguridad. Con tratamiento de los efluentes peligrosos sólidos y líquidos traceables. Orientar la vena de aire de expulsión contraria a la toma de aire.
- Evitar el uso de extensiones eléctricas portátiles.
- Utilizar tomas eléctricos diferentes a los de uso común, para evitar el desconectado imprudente por el personal de limpieza para conexión de sus máquinas de aseo.
- Mantener carga de agua sobre los sifones de las rejillas que atienden equipos de uso poco frecuente.
- Control de la iluminación natural, para evitar resplandor que impida leer con comodidad pantallas electrónicas.
- Establecer los luxes necesarios con luz antiactínica y controlar la entrada de UV desde otras fuentes.

Filtros HEPA, flujo laminar y cabinas de bioseguridad

Mino Covo

Introducción

Definición de filtro HEPA

Elementos de los filtros HEPA

1. *Papel filtro o medio filtrante*
2. *Separadores*
3. *Marco*
4. *Adhesivos*
5. *Burletes*

Clasificación de los filtros HEPA

Ensayo de pérdidas donde el filtro se instala

Normas de áreas limpias. Reseña histórica

Áreas de flujo laminar

Equipos de flujo laminar

Campanas o cabinas de flujo laminar

Limitaciones del flujo laminar.

Procedimientos para el uso de los equipos de flujo laminar horizontal

Bioseguridad y filtración de aire

Uso y aplicación de los equipos para protección del operador y del ambiente

El ambiente de laboratorio de bioseguridad

Equipos clase I

Equipos clase II

Certificación

Gabinets de alta seguridad clase III

Bibliografía

Introducción

En la construcción de los equipos de flujo laminar ya sean horizontales, de mesa, verticales, para producción de elementos estériles o de seguridad biológica, hay componentes que los constituyen, como los filtros HEPA, los ventiladores centrífugos, los prefiltros, y los gabinetes que alojan a los elementos antes mencionados. Todos estos equipos generan corrientes de aire filtrado unidireccional desprovisto de contaminantes, llamado de flujo

laminar. En todos los casos los gabinetes de flujo laminar tienen la doble función de proveer aire libre de impurezas y a su vez barrer toda partícula generada dentro del gabinete para mantener al producto o cultivo libre de contaminantes.

El filtro HEPA se ensaya con un aerosol con partículas de 0.3 micrones que por su tamaño se consideraban las más difíciles de filtrar.

Para tamaños menores las partículas se retienen por difusión browniana y para las de mayor tamaño predomina la retención por inercia o intercepción directa. En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se ven los efectos de retención en fibras que constituyen los filtros de aire según los 3 mecanismos de retención.

Figura 1

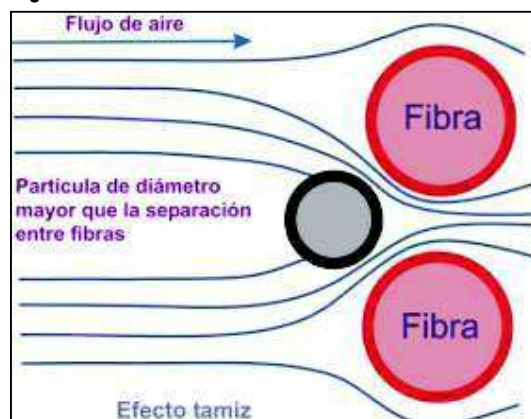


Figura 2

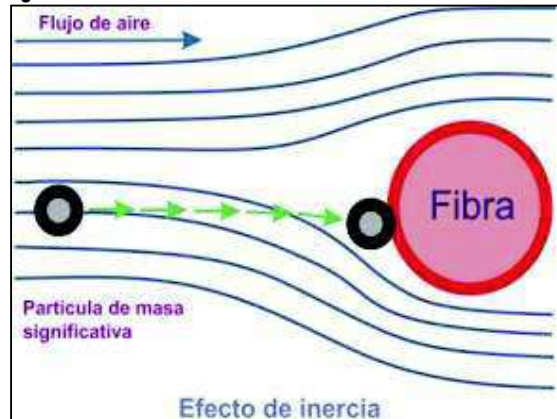


Figura 3



Figura 4

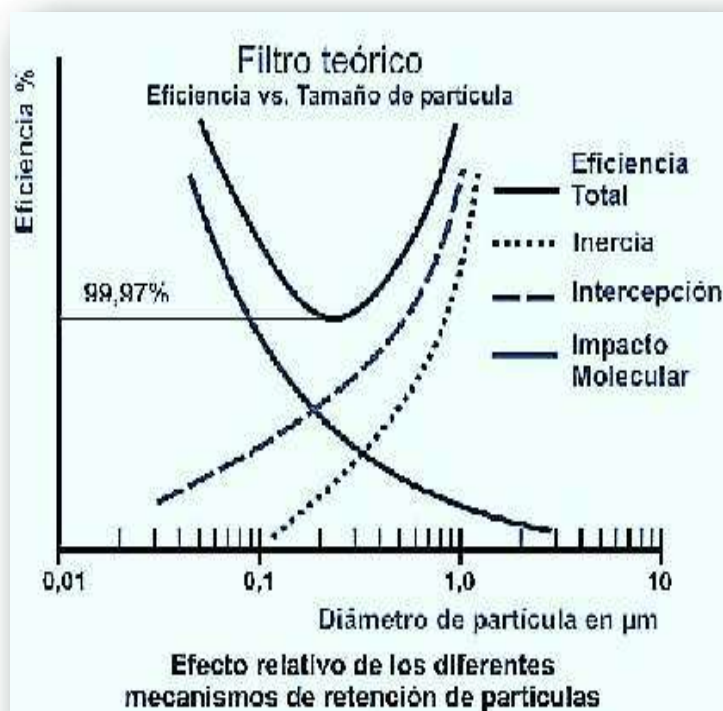


Para su certificación se desarrollaron los generadores de aerosoles de DOP de 0,3 micrones con los que se ensayan. El premio Nobel Langmuir [1] desarrolló esa teoría intentando determinar el tamaño crítico de los aerosoles a ser filtrados. Con el desarrollo de los contadores de aerosoles de rayo láser se vio posteriormente que la partícula más difícil de ser filtrada, o MPPS (*most penetrating particle size*) está en el orden de 0,12 a 0,18 μ . Sin embargo el desarrollo de Langmuir era correcto pues las partículas de menor tamaño son retenidas con mayor eficiencia por el efecto de difusión browniana. Tan es así que hasta los aerosoles virales de centésima de micrón son retenidos con mayor eficiencia que los de DOP (diocetilftalato) de 0,3 μ . Ver Figura 5.

Definición de Filtro HEPA

HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) es un filtro descartable de medio filtrante seco y extendido dentro de un marco rígido, que tiene una eficiencia mínima de retención del 99,97 % equivalente a una máxima penetración de 0,03% en diocetilftalato D.O.P. de 0,3 μ , generado térmicamente, o un aerosol alternativo especificado.

Figura 5.



ELEMENTOS DE LOS FILTROS HEPA

Los componentes del filtro son 5:

1. **Medio filtrante:** Es papel corrugado con pliegues profundos y cercanos entre sí, de modo tal que permita un caudal de aire suficientemente grande. Puede llegar a usarse una superficie de papel hasta 50 veces mayor que la sección plana de entrada del filtro.
2. **Separadores:** Son elementos que mantienen los pliegues del papel separados, dando rigidez mecánica a la superficie filtrante.
3. **Marco:** Es la caja rígida dentro de la cual se halla el medio filtrante y los separadores.
4. **Adhesivo:** Es el producto que une el papel de filtro al marco
5. **Burletes:** Revisten la superficie del marco donde éste se une al soporte portante del filtro, dando estanqueidad al sistema.

1. Papel filtro o medio filtrante.

En las primeras tentativas de fabricación de materiales de alta eficiencia se utilizaron fibras relativamente groseras como soporte de fibras de amianto. Posteriormente, fueron hechos papeles de celulosa y amianto, vidrio, amianto y vidrio, fibras plásticas y cerámicas.

El papel de celulosa y amianto fue el más barato de los medios filtrantes. En él las fibras celulósicas relativamente gruesas servían de soporte a las de amianto que son de diámetros de pocos micrones. Están en desuso por ser el amianto potencialmente cancerígeno.

El papel de vidrio es actualmente el más común de los medios filtrantes. Esto se debe a que la mayoría de sus microfibras es inferior al micrón. Con fibras plásticas se han fabricado medios de polietileno, polipropileno y nylon con diámetros de fibras entre 0,5 y 1,5 micrones. Tienen buena compatibilidad química, pero poca resistencia a las altas temperaturas. Las partículas de materiales costosos se pueden recuperar disolviendo el

medio filtrante para su separación.

Las microfibras cerámicas se utilizan cuando es necesario trabajar con altas temperaturas (hasta 1000 °C).

2. Separadores.

En los filtros HEPA la velocidad ideal del aire a través del medio es de 2,5 cm/ seg. O sea 1,5 m/ min., siendo con esta velocidad la caída de presión de 20 mm H₂O aproximadamente, y la penetración mínima inferior al 0,03% en partículas de 0,3 micrones.

Para velocidades tan bajas es necesario aumentar la superficie efectiva del medio respecto a la sección del filtro entre 25 y 70 veces. Por ejemplo, en un filtro para 1700 m³/h de 0,36 m² de área frontal (filtro de 600 x 600 x 300mm), la cantidad de medio filtrante es de 18 m² útiles. Esto es obtenido con pliegues continuos y profundos del papel, que se mantienen paralelos y espaciados.

Para evitar que los pliegues adyacentes se superpongan entre si se usan separadores que pueden ser de los siguientes materiales:

- Papel Kraft o cartón: son los más baratos, sin embargo tienen poca resistencia a la humedad y al calor.
- Aluminio: Resisten hasta 300° C y son aplicados en filtros que deben ser resistentes a la humedad.
- Acero inoxidable. Son usados solo en casos especiales
- Cordones adheridos al medio. Fabricantes europeos han desarrollado filtros donde el medio filtrante se mantiene separado por medio de cordones adheridos al papel para mantener su conformación lisa, con la ventaja de poder disponer de más medio filtrante por unidad de volumen. Pueden mantenerse así iguales caudales con menores caídas de presión.
- En la actualidad los separadores más usados son los de un adhesivo que se inyecta en la superficie del papel poco antes de ser corrugado y al secarse en el momento del plegado, aumenta la cantidad de pliegues obteniéndose un filtro de mayor superficie filtrante.

3. Marco

Inicialmente los filtros HEPA más comunes eran fabricados con marcos de madera aglomerada o terciada. Su mayor inconveniente era su poca resistencia a la humedad. La madera puede hincharse, desplazándose el burlete, perdiéndose la estanquidad y permitiendo fugas o pérdidas entre el burlete y el marco de sustentación. Se usan cuando es necesario incinerar el filtro una vez saturado.

Los marcos metálicos usados en la mayoría de las aplicaciones son de chapa galvanizada o cadmiada. Los marcos plásticos se usan en general en filtros de muy pequeño tamaño.

Actualmente, los filtros para equipos de flujo laminar y los módulos tienen como marco perfiles de aluminio.

4. Adhesivos

Una vez obtenido en la fabricación el medio filtrante corrugado se adhieren los extremos al marco por medio de adhesivos de los siguientes tipos:

- Adhesivos de tipo goma y siliconados: son los más comunes donde no se requiere alta resistencia a la temperatura.
- Adhesivos refractarios: para altas temperaturas. Figura 6

5. Burletes

Los materiales usados para ésta aplicación cumplen la función de evitar las fugas entre los filtros y la estructura portante. Según sus aplicaciones son de los siguientes tipos:

- Goma: solamente usados para bajas temperaturas.
- Neoprene: los más usados.



Figura 6

- Fibras de vidrio y minerales: se aplican donde se deben soportar altas temperaturas.

Es fundamental el buen cierre con los burletes, de lo contrario habrá pérdidas.

CLASIFICACIÓN DE LOS FILTROS HEPA

Si bien los filtros HEPA fueron inicialmente ensayados con DOP de 0,3 μ por suponerse que era la partícula más difícil de ser filtrada, se descubrió después que el aerosol de mayor penetración es de tamaños que fluctúan entre 0,1 y 0,2 μ .

Además se verificó con el desarrollo del flujo laminar que filtros HEPA que cumplían con la definición de eficiencia podían tener pequeñas pérdidas (*pin holes*) por las cuales entraría aerosol contaminante en cantidades mínimas. Por ello la norma IEST-RP-CC01.3 HEPA and ULPA Filters recomienda el ensayo de pérdidas por barrido del filtro HEPA con toma muestras, para su eventual reparación y sellado [6]

Cuando a un filtro HEPA certificado como de 99,97% en DOP, se le sellan las pequeñas pérdidas (*pin hole*) su eficiencia aumenta llegando así a tener filtros de 99,99% de eficiencia (Filtros HEPA tipo C y D), como se ve en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo IEST	Caudal Ensayo	Tamaño de partícula en μ	Eficiencia mínima %	Ensayado por pérdidas
A	Normalizado	0,3	99,97	No
B	Normalizado y 20%	0,3	99,97	No
C	Normalizado	0,3	99,99	Sí
D	Normalizado	0,3	99,999	Sí
E	Normalizado y 20%	0,3	99,97	Sí
F	Normalizado	0,1 - 0,2	99,999	Sí

ENSAYO DE PÉRDIDAS DONDE EL FILTRO SE INSTALA

Si bien todo filtro HEPA o ULPA debe ser ensayado individualmente en fábrica como control de calidad antes de su embalaje, es posible que cuando se lo instala pueda tener algún defecto en su colocación o en el mismo filtro como se ve en la Figura 7. Por eso es recomendable el ensayo llamado DOP en frío, normalizado según la IEST, donde se define el aerosol ya sea como aceites minerales: Emery 304, aceite de maíz, etc. sustitutos de DOP aceptados [6]

Como se ve en la Figura N° 7 las pérdidas pueden ser debidas a defectos en el medio filtrante, en el adhesivo que lo pega al marco, al marco metálico de soporte y a los burletes que deben asegurar su sellado.

Este ensayo consiste en generar un aerosol por medio de aire comprimido que entra en toberas (Laskin) sumergidas en el líquido que se aerosoliza (Figura 8). La Figura N° 9 ilustra un tomamuestras que aspira el aire para llevarlo a un detector fotométrico de partículas que puedan haber penetrado el filtro. Una vez detectada la pérdida se procede a su reparación. Este aerosol que fluctúa en tamaño entre 0,2 y 2 micrones con un tamaño medio de 0,7 se inyecta aguas arriba de los filtros con una concentración de 100 mg / m³ de aire.

La medición fotométrica de pérdidas consiste en calibrar el fotómetro al 100% de su escala con el aerosol generado y cambiando de escala de 100 a 1, detectando todo punto de donde la penetración supere el 0,01% de la concentración del aerosol inyectado por barrido de la superficie del filtro.

La medición da una relación de concentraciones de aerosoles. Por supuesto, este ensayo de pérdidas es válido para aplicar en filtros de eficiencia ya certificada.

En las Figuras 10 A, B y C se muestran la verificación pérdidas en filtros HEPA

Figura 7: Pérdidas en filtros HEPA.

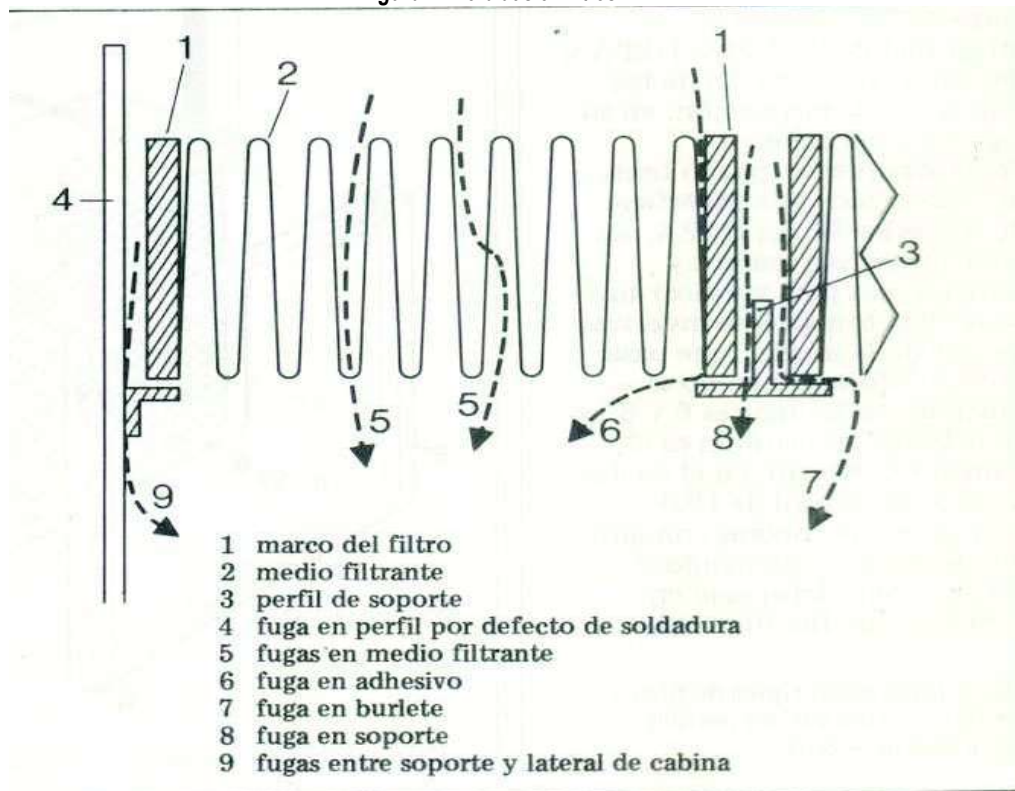


Figura 8: Generación de aerosoles

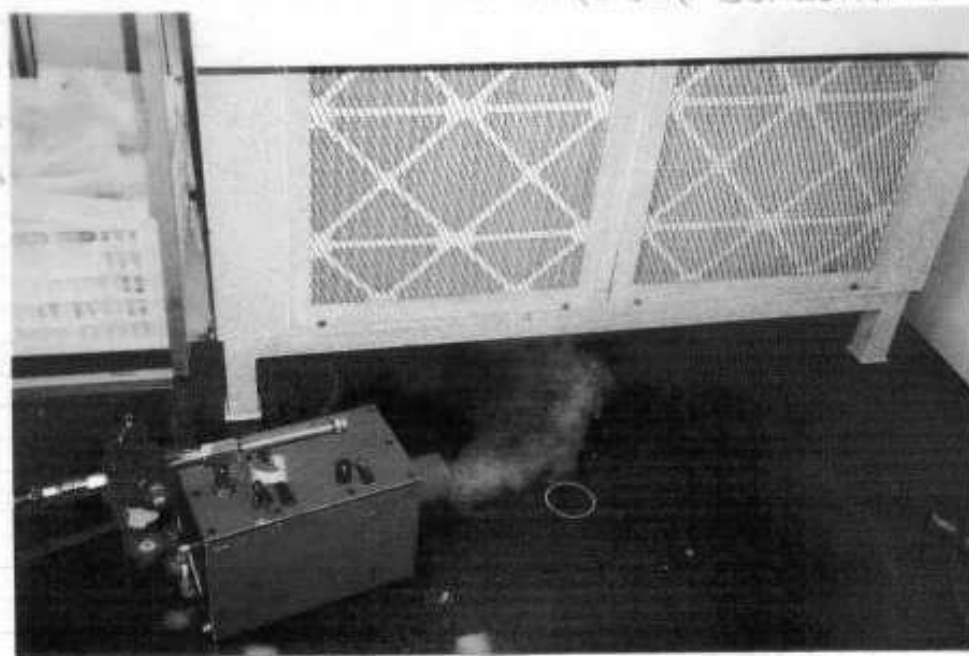


Figura 9: Pérdidas en filtros HEPA –Tomamuestras

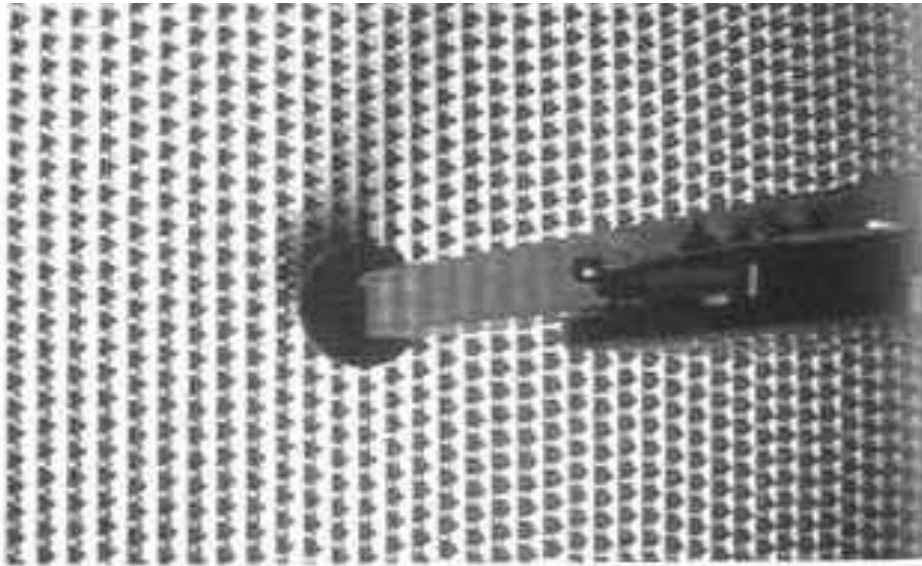


Figura 10 A: Verificación de integridad de un filtro HEPA en gabinete de flujo laminar horizontal con un detector fotométrico ATI.

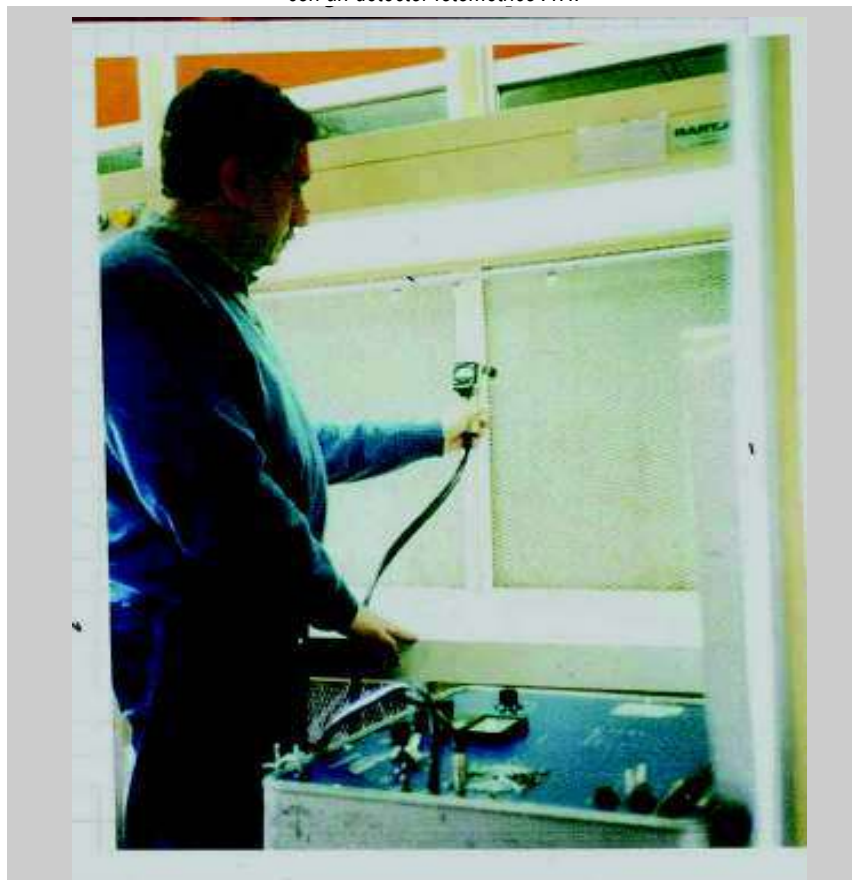


Figura 10 B: detector fotométrico ATI



Figura 10 C: Detección de pérdidas en un banco de filtros HEPA.

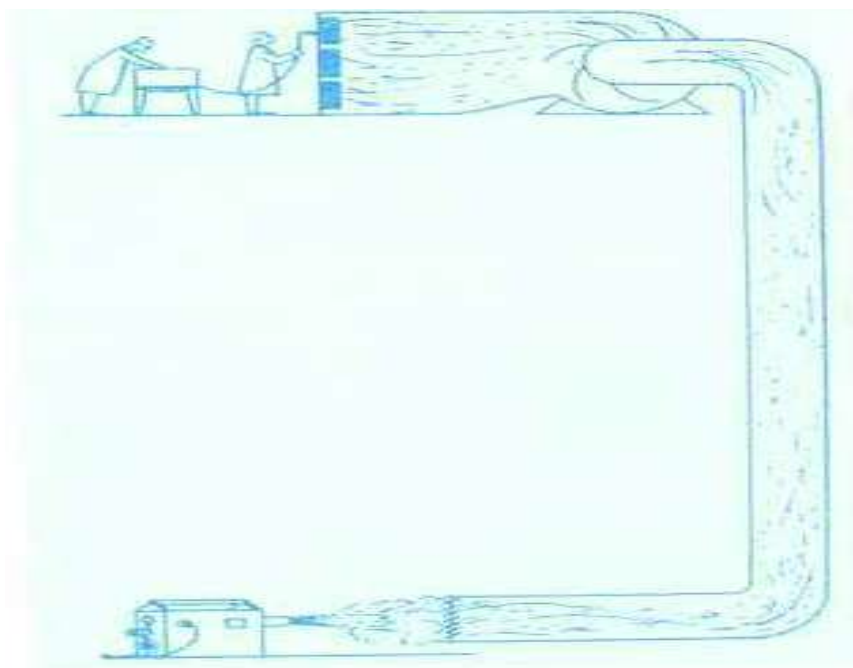


Figura 11 A: Medición de velocidad de aire con anemómetro de hilo caliente



Figura 11 B: Medición de velocidad con anemómetro de hilo caliente Alnor dentro de un equipo de seguridad biológica con conteo de partícula con contador de rayo láser PMS



Velocidad de aire en equipos de flujo unidireccional Norma IEST-RP-CC002,2

La norma del *Institute of Environmental Sciences* IEST establece como velocidad en un equipo de flujo unidireccional horizontal (clean bench) 0,45 m/ seg +/- 0,05 m/ seg; 0,90 pies/ min +/- 10 pies/ min.

Para lo anterior es necesario el uso de un anemómetro de hilo caliente cuya máxima desviación standard sea del 15%. Ver Figuras 11 A y B.

Normas de áreas limpias. Reseña histórica

Prácticamente todo el desarrollo de los sistemas de control de contaminación y áreas limpias aconteció a partir de fines de la década del 50. Los primeros desarrollos metódicos con normas específicas se debieron a la industria fotográfica y a los laboratorios de la Fuerza Aérea de EEUU, donde ya se revelaban y ampliaban películas fotográficas o se fabricaban sistemas de guía para aeronaves y cohetes con la aplicación de giróscopos. Distintas normas se aplicaron para áreas en donde los requerimientos de limpieza de aire eran muy estrictos.

Al comienzo de estos desarrollos la Comisión de Energía Atómica de Estados Unidos, la NASA y el Comando de Cohetería y Misiles del Ejército comenzaron a requerir áreas limpias con conteos inferiores las 100.000 partículas por pie cúbico, es decir no más de 3.500 por litro. Con el lanzamiento de satélites por EEUU y la Unión Soviética en 1957 y 1958 la carrera del espacio había comenzado, y los sistemas de guías misilísticas empezaron a ser de tamaños mínimos. En consecuencia, con tripulaciones humanas enviadas al espacio, la confiabilidad de los equipos debía ser máxima, es decir, el porcentaje admisible de fallas debía tender a cero. La investigación y desarrollo para lograr áreas de contaminación controlada muy limpias se incentivó para mejorarlas, pero también para disponer de métodos de ensayo para certificar los controles de las mismas.

La primera norma que se utilizó fue la *Air Force Technical Order* # 00-25-203 en 1961. Trajo consigo dicha publicación de procedimientos para construir, operar y certificar áreas limpias, estableciendo cuatro clases de niveles de limpieza. En 1962 los Laboratorios Sandia de Albuquerque, New México, U.S.A, anunció el desarrollo de áreas de flujo laminar y en 1963 se editó la primera Norma Federal 209. Estas áreas fueron un gran avance en el control de contaminación al llegarse a tener menos de 100 partículas por pie cúbico, es decir, como máximo 3,5 por litro, lo que significa una reducción de 1000 veces del nivel de contaminantes de las primeras

áreas limpias.

Luego en 1966, la primer área de flujo laminar fue instalada como sala de operaciones en Nuevo Méjico en EEUU y se revisó la Norma Federal 209 incorporando el flujo laminar. Se publicaron también normas adicionales y complementarias por ASTM y la Asociación Americana de Control de Contaminación AACC publicó la Norma CS-6 detallando los Métodos de ensayo y certificación de las áreas limpias en 1972. Años después, se forma sobre la base de la AACC el *Institute of Enviromental Sciences*, IES, que publicará la norma IES-RP-CC-006 sobre Ensayo en Áreas Limpias.

La norma Federal 209 fue la más comúnmente aplicada a través de sus diferentes revisiones, siendo la más usada la revisión 209D de 1988 y la 209E de Septiembre de 1992. En ellas se especificaban los métodos para el recuento de partículas por tamaño con contadores fotométricos de rayo láser, así como los métodos para su certificación y validación incluyéndose los ensayos de los filtro HEPA. Ver Tabla 2.

Aparte de estas normas debe cumplirse con condiciones sobre nivel de iluminación, sonido, humedad relativa, velocidad de aire, número de renovaciones, etc. Actualmente todas estas normas han sido sustituidas por las ISO 14644 [7] en las que los recuentos de partículas se hacen por m³ sustituyendo los recuentos que se hacían por pie³

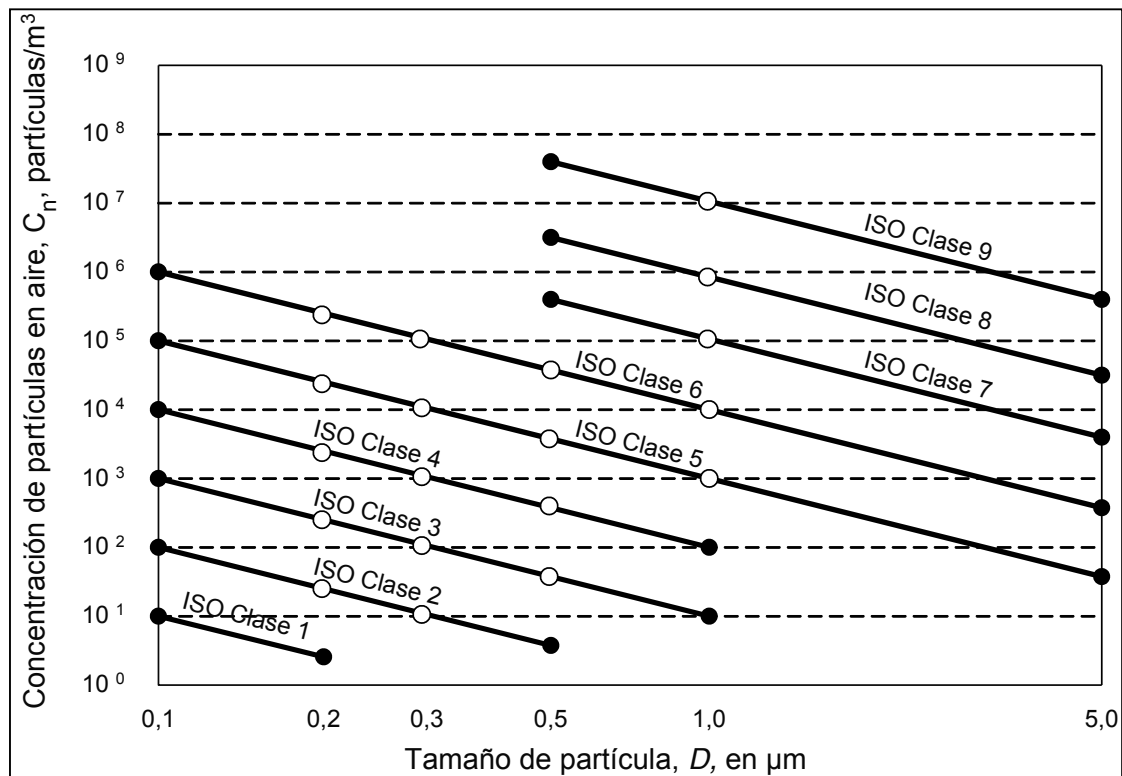
Tabla 2. Federal Standard 209E

Class Name		Class limits									
		0.1 µm		0.2 µm		0.3 µm		0.5 µm		5 µm	
		Volume units		Volume units		Volume units		Volume units		Volume units	
SI	English	m ³	ft ³	m ³	ft ³	m ³	ft ³	m ³	ft ³	m ³	ft ³
M 1		350	9.91	75.7	5.14	30.9	0.875	10.0	0.283	-	-
M 1.5	1	1 240	35.0	265	7.50	106	3.00	35.3	1.00	-	-
M 2		3 500	99.1	757	21.4	309	8.75	100	2.83	-	-
M 2.5	10	12 400	350	2 650	75.0	1 060	30.0	353	10.0	-	-
M 3		35 000	991	7 570	214	3 090	87.5	100	28.3	-	-
M 3.5	100	-	-	26 500	750	10 600	300	3 530	100	-	-
M 4		-	-	75 700	2 140	30 900	875	10 000	283	-	-
M 4.5	1 000	-	-	-	-	-	-	35 300	1 000	247	7.00
M 5		-	-	-	-	-	-	100 000	2 830	618	17.5
M 5.5	10 000	-	-	-	-	-	-	353 000	10 000	2 470	70.0
M 6		-	-	-	-	-	-	1 000 000	28 300	6 180	175
M 6.5	100 000	-	-	-	-	-	-	3 530 000	100 000	24 700	700
M 7		-	-	-	-	-	-	10 000 000	282 000	61 800	1 750

Tabla 3: Tabla 1 de la Norma ISO 14644-1:1999

ISO 14644-1:1999 Tabla 1						
Clases seleccionadas de limpieza de partículas suspendidas en aire, para áreas y zonas limpias						
ISO Número de clasificación (<i>N</i>)	Límites de máxima concentración (partículas / m ³ de aire), para partículas iguales o mayores que los tamaños considerados abajo (los límites de concentración se calcularon de acuerdo con la ecuación (1) en 3.2)					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1,0 µm	5,0 µm
ISO Clase 1	10	2				
ISO Clase 2	100	24	10	4		
ISO Clase 3	1 000	237	102	35	8	
ISO Clase 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
ISO Clase 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO Clase 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO Clase 7				352 000	83 200	2 930
ISO Clase 8				3 520 000	832 000	29 300
ISO Clase 9				35 200 000	8 320 000	293 000
NOTA Las incertidumbres relacionadas con el proceso de medición requieren que los datos de concentración se usen con no más de tres dígitos significativos al determinar el nivel de clasificación						

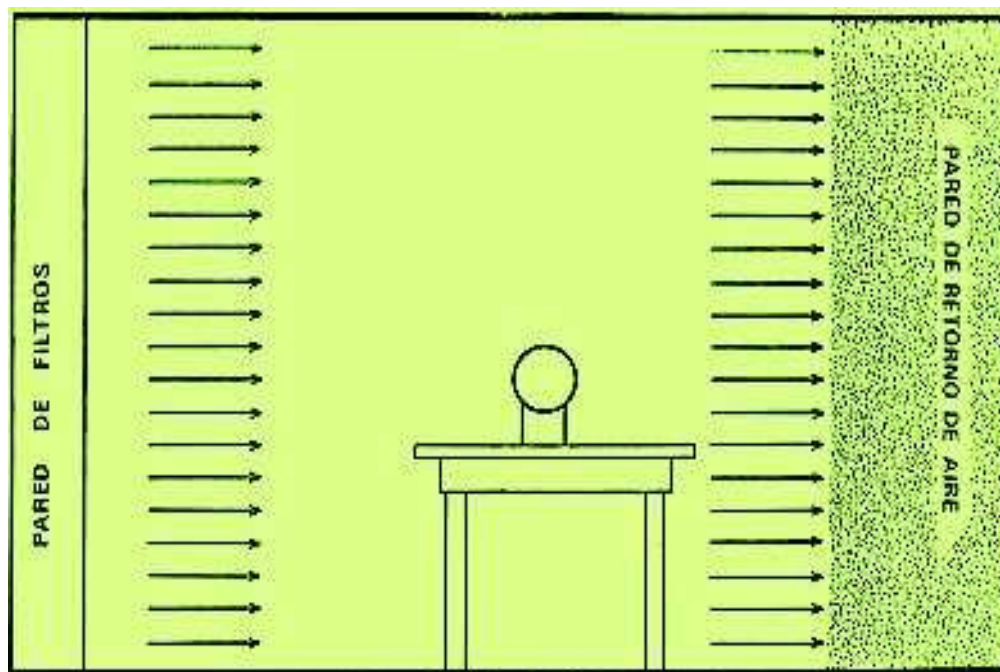
Gráfico 1: Representación gráfica de la Tabla 1 de la ISO 14644



Áreas de flujo laminar

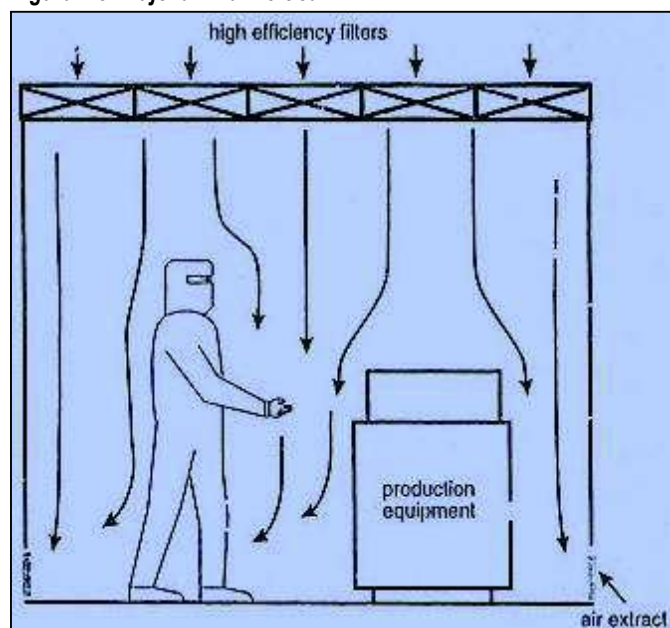
Dividiéndose las fuentes de contaminación en aire exterior y generación en el interior del aérea y solucionándose el primero de los problemas por la utilización adecuada de filtros HEPA, se buscó un mecanismo que sirviese para barrer la contaminación emitida interiormente.

Figura 12. Flujo laminar horizontal



Entre 1961 y 1962 un equipo científico encabezado por el Dr. Willis Whitfield, comenzó ensayando el envío de aire al local a través de filtro HEPA a mayores velocidades, lo que fue contraproducente. Pero luego se construyeron dos áreas, la primera formada por un cielorraso completo de filtros HEPA dispuestos horizontalmente y la segunda con una pared de filtros HEPA con circulación horizontal de aire sobre la mesa de trabajo.

Figura 13. Flujo laminar vertical



Ensayando diversas velocidades de desplazamiento de aire se llegó a tener el área, llamada entonces clase 100 (hoy clase 5), es decir no más de 100 partículas por pie³ ó 3,5 por litro de aire de 0,5 micrones y mayores. A ese mecanismo se lo denominó FLUJO LAMINAR por su semejanza al movimiento de ese tipo en mecánica de fluidos. En las Figuras 12 y 13 se ve la representación esquemática de áreas de flujo laminar horizontal y vertical respectivamente. En ella las velocidades del aire en las superficies de trabajo son ligeramente menores que las habituales a la salida de los filtros y las líneas de desplazamiento se mantiene paralelas en todos sus puntos y uniformes en el espacio y en el tiempo. Evidentemente, se había logrado el mecanismo de autolimpieza de las áreas limpias y se implementó la Norma

Federal 209 B de la que resumiremos los conceptos fundamentales.

Según la Norma 209, “Se llama Flujo Laminar a una corriente de aire previamente filtrado por filtros HEPA cuya masa toda se desplaza en líneas paralelas a una velocidad uniforme de 90 pies/ min ∇ 20 pies/ min (27metros/ min $\pm$ 6 metros/ min)”.

Las velocidades de aire especificadas por la Norma han sido calculadas en función de poder expulsar de las áreas las partículas que allí se encuentran sin permitir su caída sobre los elementos en elaboración, o control. Así, el flujo laminar actúa como un pistón de aire limpio que se desplaza dentro de un cilindro barriendo fuera de las áreas las partículas en ellas generadas.

Las normas Fed Std 209 a y sus revisiones b, c, d definían las clases según el número de partículas por pie cúbico (cf): Recién con la norma Fed Std 209E se definieron las clases por unidades inglesas y métricas cft y m³.

A partir del año 2000 se definen las normas ISO 14644 para áreas limpias donde se utiliza el sistema métrico internacional SI definiéndose las clases según la fórmula

$$C_n = 10^N \times \left(\frac{0,1}{D} \right)^{2,08}$$

donde

C_n representa la concentración máxima permitida en partículas por m³ de aire, iguales o mayores que el tamaño de partículas considerado. C_n se redondea al número entero más cercano.

N es el número de clase ISO que no debe exceder el valor de 9. Los números ISO intermedios pueden ser especificados considerando a 0,1 como el mínimo incremento de N permitido.

D es el tamaño en micrones de la partícula considerada 0,1 es una constante

La Tabla 3 que forma parte de la norma ISO permite su comparación con la Fed Std 209 E.

Las nuevas clases ISO pueden convertirse a Fed Std dividiendo por 35,2 el número de partículas por tamaño. Dividir por 35,2 convierte m³ a pie cúbico. Por ejemplo la ISO 5 equivale a la vieja clase 100 por tener 3520 partículas en 0,5 micrones y mayores por m³.

En el Gráfico 1 se ve la representación gráfica de la Tabla 3.

Equipos de flujo laminar.

Mesadas de flujo laminar horizontal:

Cuando se controlan productos alimenticios, veterinarios y farmacéuticos, es común usar las mesas de flujo laminar horizontal llamadas vulgarmente “clean-bench”.

Constan de un gabinete metálico con un banco de filtros HEPA dispuestos en un plano vertical, prefiltros, un ventilador centrífugo, una mesada plástica o de acero inoxidable y vidrios laterales con un techo de luces fluorescentes. El ventilador impulsa a los filtros HEPA aire ambiente que es aspirado a través de los prefiltros. El aire se desplaza entonces en líneas unidireccionales paralelas, perpendiculares a los filtros HEPA, barriendo cualquier contaminante generado sobre una mesada como si un pistón de aire estéril se moviera dentro del cilindro formado por un techo iluminado, la mesada y los vidrios o acrílicos laterales.

Estos equipos sirven para evitar que al controlar la calidad microbiológica, el producto se contamine con bacterias, hongos o levaduras dispersas en el ambiente. Estos equipos se usan en industrias tan variadas como aguas minerales, gaseosas, vinos, cervezas, alimentos, productos farmacéuticos, etc.

Tabla 4: Contaminantes generados por los individuos por minuto

Tipo de movimiento	Partículas por minuto ($> 0,3 \mu$)
Sentado o parado inmóvil	100.000
Sentado con leve movimiento de cabeza brazos o manos	500.000
Sentado con leve movimiento del cuerpo	1.000.000
Al levantarse de una silla	2.500.000
Caminando a 0,9 m/s	5.000.000
Caminando a 1,6 m/s	7.500.000
Jogging a 8 km/h	10.000.000
Subiendo escaleras	10.000.000
Realizando ejercicios o corriendo	15.000.000 a 30.000.000

Las áreas limpias y los gabinetes de flujo laminar cumplen 2 funciones, la primera es proveer aire libre del contaminante exterior y la segunda es barrer con el contaminante generado por los individuos en el interior del gabinete. En la Tabla 4 se ilustra la cantidad de partículas generadas por los individuos y en la Figura 14 se ven aerosoles generados por nariz y boca.

En el año 1963 un equipo liderado por el Dr. Willis Whitfield construyó el primer equipo de flujo laminar horizontal (Figura 15). Fue el gran descubrimiento porque con ello bajó el nivel de contaminación relativa mil veces con respecto a un área limpia convencional (clasificada entonces como clase 100.000 la convencional y clase 100 la de flujo laminar). Ver Tablas 2 y 3. Es decir de 100.000 partículas por pie^3 a 100 partículas por pie^3 equivalentes a 3500 por litro en oposición a 3,5 por litro. Actualmente según norma ISO clase 5 significa 3520 partículas por m^3 .

Figura 14. Aerosoles generados por nariz y boca.



Figura 15. Primer área de flujo laminar

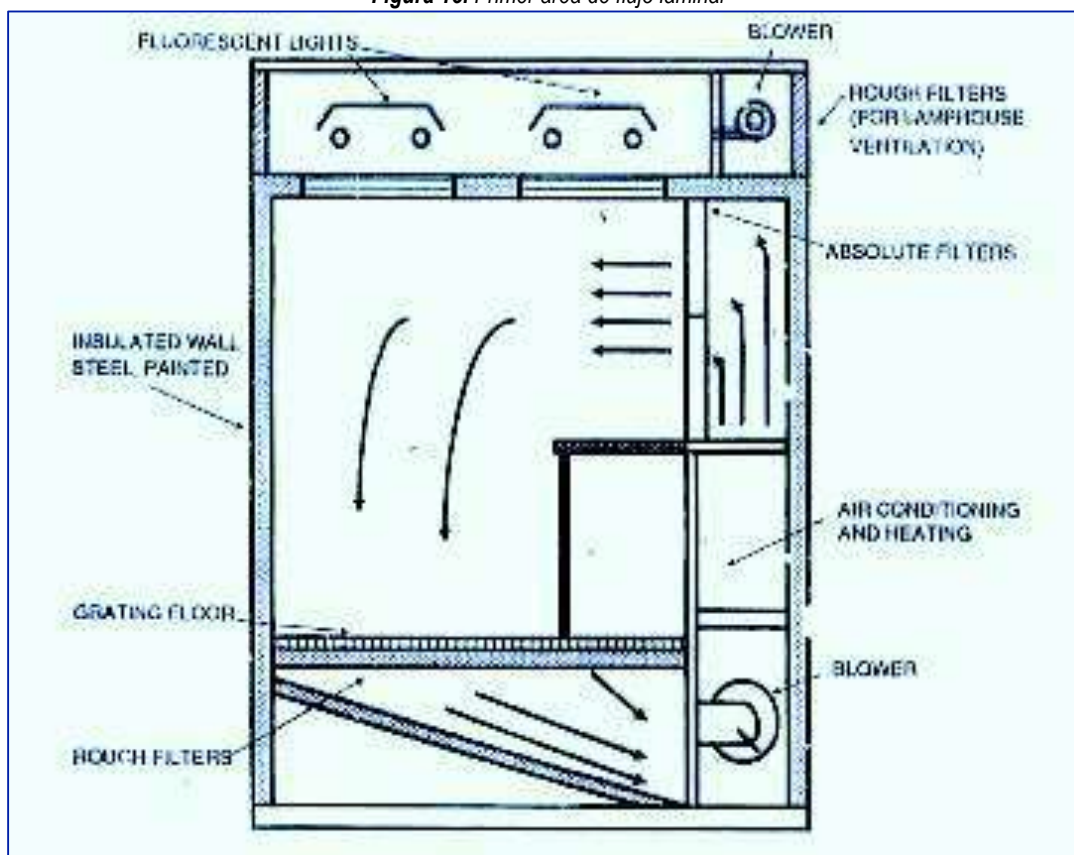
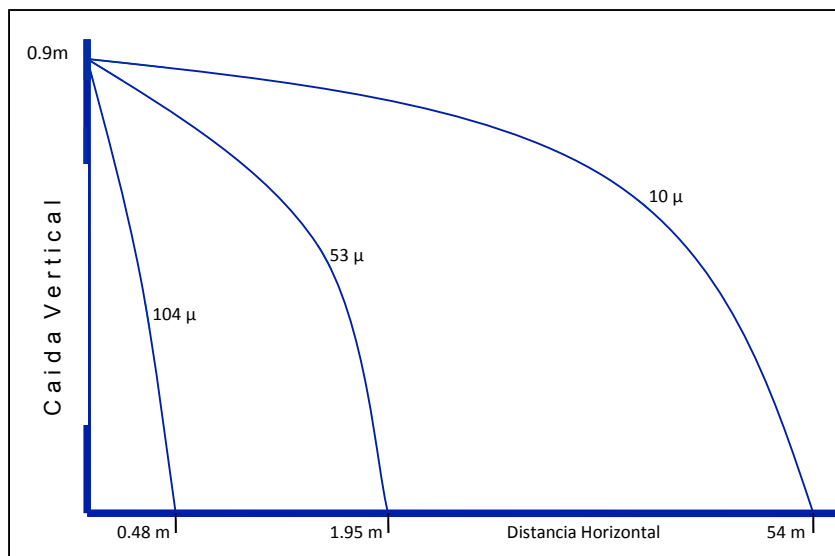


Figura16. Desplazamiento horizontal

Se desarrolló entonces la norma 209 A que definía flujo laminar como una corriente de aire filtrado con filtros HEPA de una eficiencia mínima del 99,97 % en aerosoles de DOP de $0,3 \mu$ que se desplaza a una velocidad de 90 pies/ min $\pm$ 20 pies/ min (0,45 m/ seg. $\pm$ 0,1 m/ seg).

Figura 16. Desplazamiento horizontal para diferentes tamaños de partículas



La razón de esta velocidad se ve en la Figura 16, donde se ve el desplazamiento horizontal para diferentes tamaños de partículas. Se aprecia que una partícula relativamente grosera de 10 micrones se desplaza 54 metros en sentido horizontal antes de caer 0.9 metros en el sentido vertical. Es decir, la relación de desplazamiento horizontal con respecto al vertical es de 60 a 1. Si aplicamos esta relación de composición de movimientos a una mesa de flujo laminar horizontal cuya profundidad es de unos 50 a 60 cm y suponemos que de las manos del operador se desprende una partícula de 10 a 15 micrones, ésta será barrida fuera del área de trabajo sin contaminar el cultivo con el que se está trabajando.

Los niveles de limpieza de estas áreas pueden demostrarse por el hecho de que no hay rayo de luz visible dentro de ambientes de esta clase. Si encendiéramos un proyector de cine en un extremo del área, solamente veríamos la imagen proyectada en la pared opuesta, sin distinguir el rayo de luz, dado que éste es visible debido al reflejo de las partículas suspendidas en el aire.

Campanas o cabinas de flujo laminar

Las cabinas de flujo laminar se ubican sobre las zonas de envasado de productos que deben mantenerse libres de contaminación. En ellas el aire ambiente es aspirado por ventiladores centrífugos a través de los prefiltros, y se inyecta a través de un plano horizontal de filtros HEPA. El aire se desplaza entonces en una corriente vertical de líneas paralelas unidireccionales a una velocidad de 0,5 m/seg, siendo las cortinas laterales las guías de flujo de aire. Toda llenadora de ampollas inyectables para uso humano debe ser provista de un flujo de aire clase 100 (ISO 5), es decir, de una campana de flujo laminar.

Otros ejemplos de aplicaciones se dan en las usinas lácteas sobre máquinas envasadoras de yogurt, llenadoras de leche chocolatada y en las productoras de bebidas, en las llenadoras de aguas minerales, entre otros.

En la Figura 17 vemos como el operador no sólo trabaja en una zona inadecuada (los materiales que se interponen entre los filtros HEPA y la zona crítica interrumpen el flujo laminar generando turbulencias), sino que además el operador comete una grave error al disponer su mano izquierda entre los filtros HEPA y el elemento crítico, por lo que éste queda ubicado en una zona de turbulencias provocada por la mano, que además es un generador de partículas contaminantes.

La figura demuestra como dos operadores trabajan con elementos críticos en una zona de turbulencias producida por tubos de ensayo dispuestos en su soporte, entre los filtros HEPA y la zona de trabajo. Independientemente de su configuración y tamaño, todos los equipos de flujo laminar horizontal tienen algo en común. Todo el plano vertical sobre la mesada está formado por filtros HEPA. La mesada, el techo de luces y los vidrios o acrílicos laterales constituyen guías para el desplazamiento del flujo de aire en forma unidireccional.



Figura 17. Mal uso al llenar en zona de turbulencias

El aire ultrafiltrado se desplaza como un pistón dentro de un cilindro, barriendo por su régimen laminar cualquier partícula generada en el interior del equipo. Todas las superficies son lisas, siendo la sección de salida de aire

idéntica a la sección de filtros HEPA de entrada.

La función del prefiltro es aumentar la vida útil del filtro final. Se lo ubica en la sección de entrada de aire al ventilador y es fundamental cambiarlo cuando se acerca su punto de saturación. Figura 18.

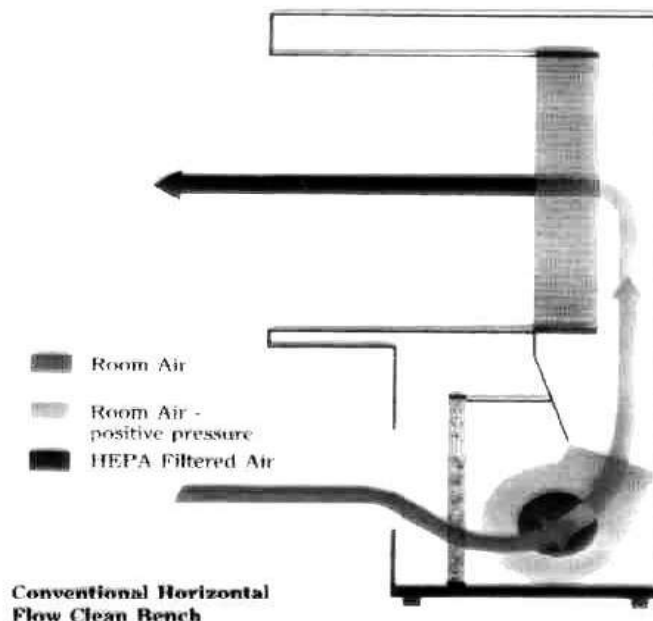


Figura 18. Diagrama de flujo de aire en una mesa de flujo laminar

Un ventilador centrífugo (Figura 19) provee la potencia para mantener el caudal de aire constante. Para ello se usan motores de velocidad variable (se aumenta la velocidad a medida que se ensucia el filtro) o, de no contar con estos motores, se opta por intercalar rejillas de regulación de caudal que se irán abriendo a medida que aumente la caída de presión en el filtro HEPA, por su ensuciamiento. En el pleno, que es una cámara de presión, se distribuye la misma de manera de desplazar el aire uniformemente, asegurando caudal y velocidad facial constantes.



Figura 19. Ventilador centrífugo

Limitaciones del flujo laminar

El usuario debe entender las limitaciones del flujo laminar debidas a las turbulencias originadas por los materiales y el operador, que pueden originar contaminaciones:

Turbulencias originadas por interponer elementos entre el filtro HEPA y el producto:

Las turbulencias se originan cuando un objeto se interpone entre el banco de filtros HEPA y el producto. Un ejemplo obvio está ilustrado en la Figura 20. Partículas desprendidas de la mano pueden, en régimen turbulento, depositarse sobre el elemento estéril. La forma adecuada de trabajo es la que se muestra en la Figura 21.

Es importante que los objetos que deben ser mantenidos estériles estén bajo flujo laminar en la zona más limpia, es decir en un plano paralelo al banco de filtros HEPA dispuesto a unos 10 cm del mismo. Hay que considerar que el aire más limpio es aquel que más cercano se encuentra al banco de filtros HEPA.

Figura 20. Incorrecto



Figura 21. Correcto



Contaminación por movimientos transversales.

Tengamos en cuenta que la corriente de aire en flujo laminar es una tenue brisa. La norma indica 90 pies/ min $\pm$ 20 pies/ min como velocidad de desplazamiento de aire en régimen laminar, lo que equivale a aproximadamente 0,5 m/ seg igual 1,80 km/ hora. Cualquier movimiento brusco originado por el operador puede desplazar aire transversal al flujo a una velocidad mucho mayor, lo que puede traer como consecuencia que partículas en un estrato del flujo laminar se desplacen sobre el producto estéril (Figura 22).

Figura 22. Movimientos transversales



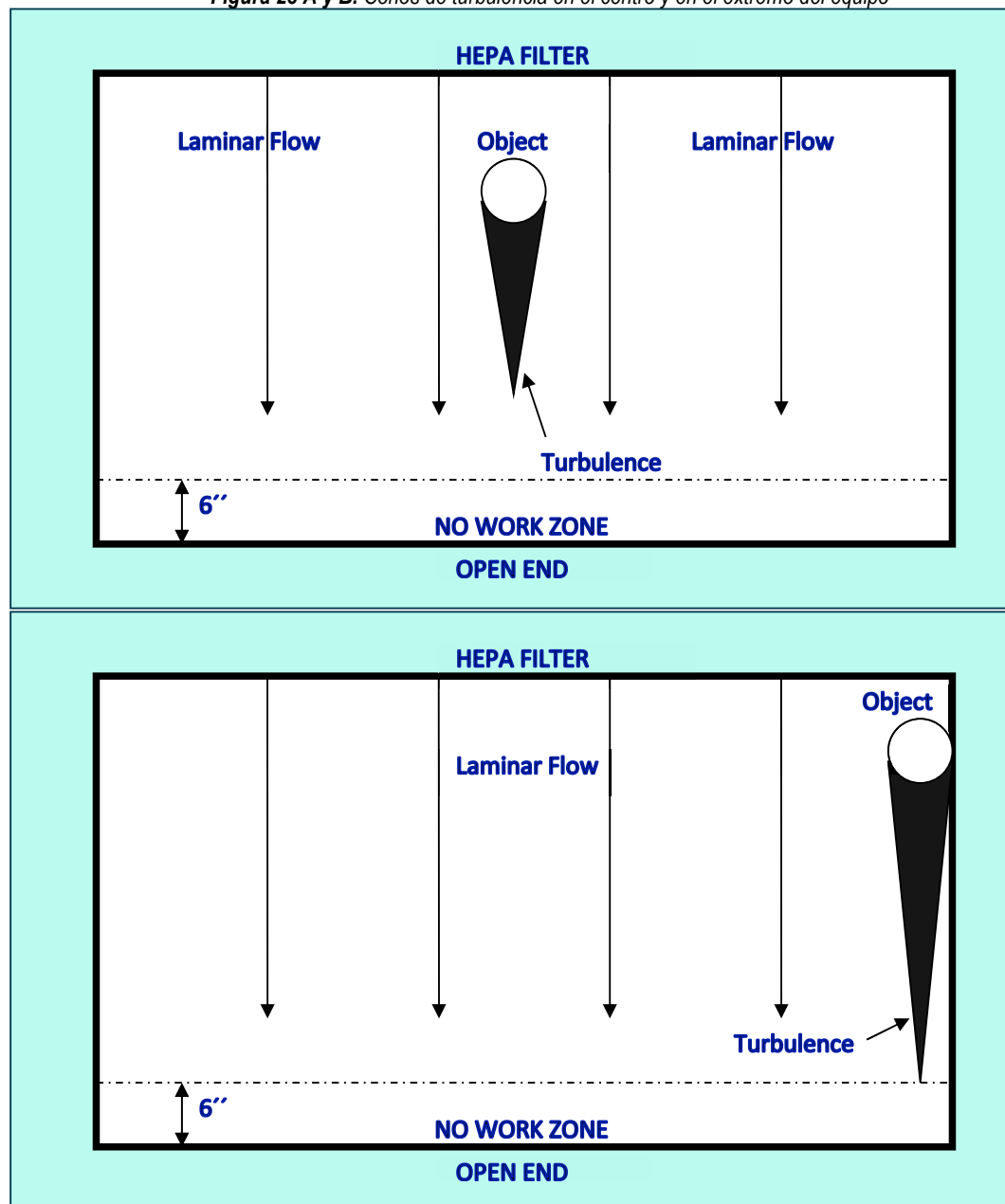
La contaminación generada por partículas desplazadas por corrientes de aire transversales al flujo, también pueden originarse en el área circundante al flujo laminar y produciría la entrada de contaminantes del ambiente al equipo.

Contaminación aguas abajo del flujo

Todo objeto colocado en una zona de flujo laminar genera una turbulencia en forma de cono, que se recompone a flujo laminar, a 3 veces el diámetro del objeto en el sentido del flujo. Cuando el objeto está circundado por flujo laminar asimétricamente (de un lado solo) el cono de turbulencias será de 6 veces el diámetro del objeto

Lo anterior se ilustra en las Figuras 23 A y B, donde se ve que la altura del cono de turbulencias es proporcional al ancho del objeto; en el centro de la mesa el largo del cono es 3 veces el ancho del objeto, y en el caso de un objeto situado en el extremo del equipo, el cono de turbulencia tiene una altura 6 veces el ancho del objeto.

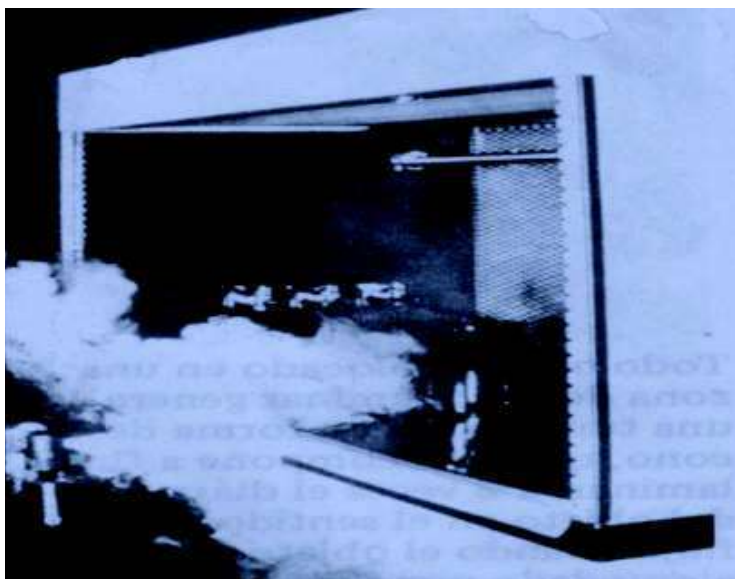
Figura 23 A y B. Conos de turbulencia en el centro y en el extremo del equipo



Veamos la consecuencia de tener un objeto dentro del flujo laminar, cuyo cono de turbulencias tiene el vértice exterior al equipo. La turbulencia toma una forma desordenada de movimientos de aire que origina la entrada de contaminantes del ambiente exterior. Lo anterior se visualiza claramente generando humo debajo de la mesada de flujo laminar, (Figura 24) el que se introduce en sentido contrario al flujo dentro del cono de turbulencias hacia el objeto.

Figura 24. *Turbulencia en el exterior del equipo*

Estudios realizados con contadores demostraron que es muy difícil obtener clase 100 en el espacio limitado entre el borde exterior de la mesa y una línea paralela situada a 15 cm hacia el interior de la misma. Los recuentos de partículas con que se hizo el experimento fueron realizados dentro de la mesa a 15 cm de su borde y en consecuencia se llegó a una primera conclusión: que ningún elemento debe ser colocado en esa área, más aún es conveniente que los elementos estériles estén dispuestos alrededor de 10 cm de distancia del filtro HEPA. Como método más seguro, debe considerarse que ningún elemento dentro del flujo debe tener



el vértice del cono de turbulencias fuera del mismo. Más aún, se aconseja para extremar precauciones que los vértices de los conos de turbulencias no sobrepasen la línea imaginaria dispuesta paralela al borde, a 15 cm del mismo. De esta manera se bajará al mínimo el riesgo de entrada de contaminantes externos.

Procedimientos para el uso de los equipos de flujo laminar horizontal

A continuación damos una serie de recomendaciones prácticas para el uso adecuado del flujo laminar.

- Es primordial limpiar la superficie de trabajo del equipo con una solución de isopropanol al 70 %, utilizando para la limpieza una esponja o tela de material sintético que no desprenda fibras. Si el equipo no funciona las 24 horas, durante el tiempo de parada aerosoles ambientales pueden depositarse sobre su superficie. Este procedimiento de limpieza es elemental.
- Poner en marcha el ventilador y mantener el equipo en funcionamiento antes de empezar el trabajo. Esto permite eliminar todo riesgo de aerosoles ambientales en el interior del equipo. En muchos casos hay usuarios que mantienen los equipos en funcionamiento 24 horas por día evitando la necesidad de este procedimiento.
- El personal debe usar ropa adecuada que no desprenda fibras.
- En lo posible todos los productos no estériles introducidos en el equipo deben ser lavados o desinfectados con soluciones de isopropanol al 70 % antes de ser ubicados dentro del flujo laminar. Este procedimiento reduce la posibilidad de contaminación por contacto o para el posible desprendimiento de partículas de superficies contaminadas.
- Es fundamental un buen lavado de manos y uñas antes de colocarse los guantes.
- Debemos recordar que es conveniente ubicar los elementos estériles en un plano paralelo al del banco de filtros HEPA, a una distancia aproximada entre 3 y 10 cm del mismo y con separación entre los elementos que permita intercalar las manos. Recordamos una vez más que el vértice del cono de turbulencias no supere la línea de 15 cm (6"), dispuesta paralela al borde exterior de la mesa de trabajo.

- En los casos donde por el tipo de operación se deba introducir equipos o elementos que se interpongan entre el banco de filtros HEPA y los elementos críticos es fundamental que los equipos sean introducidos dentro de la mesada, tan limpios como sea posible, para prevenir el desprendimiento de partículas de los mismos.
- No efectuar movimientos bruscos dentro del flujo laminar es algo de extrema importancia, no solo por la perturbación del flujo de aire, sino además, por la generación de aerosoles por el operador.
- Es importante evitar el uso de elementos puntiagudos apuntando hacia el filtro HEPA, por la posibilidad de perforar su medio filtrante, que es sumamente frágil.
- Evitar hablar mirando hacia el flujo, toser y estornudar.
- El uso de cosméticos debe ser evitado, particularmente el polvo facial, esmalte de uñas, sombras, etc. que pueden desprenderse en forma de aerosoles.
- Debe evitarse el uso de papel, telas, lápices y cinta adhesiva dentro del área de trabajo, por ser estos, elementos que generan contaminación por desprendimiento de partículas. Reemplazar por materiales que no desprendan partículas
- No usar el techo del equipo del flujo laminar para almacenar materiales, que originaran no sólo desprendimientos de partículas sino movimiento innecesario del personal.
- Mantener las actividades del personal en el área a un mínimo.
- Evitar la entrada de personal no autorizado a la cercanía del equipo.
- Mantener una rutina para el cambio de los prefiltros. Si como éstos se saturaran, provocarían una caída de presión tal que reduciría el caudal de aire a través del filtro HEPA, bajando la velocidad de desplazamiento por debajo de la admitida por la norma.
- Verificar periódicamente la velocidad del flujo laminar con un anemómetro de termocupla.
- Hacer el ensayo de integridad de los filtros HEPA cuando el equipo se instala, cuando el equipo se muda, cuando se transfiere a otra sección, o cuando ha tenido algún golpe, pues todas esas operaciones pueden provocar pérdidas en el filtro HEPA o en el burlete del mismo. Además es conveniente el chequeo de integridad acuerdo a la norma IES con una periodicidad que puede variar entre 6 meses y un año.
- Ubicación de los equipos de flujo laminar: Es fundamental ubicarlos en zonas donde no hay corrientes de aire. Lejos de puertas y zonas con movimiento de materiales

El cumplimiento, que por demás es muy simple, de los requerimientos anteriores, asegurará un trabajo con muy buenos márgenes de seguridad, trayendo el máximo beneficio en su uso.

BIOSEGURIDAD Y FILTRACION DE AIRE

Uso y aplicación de los equipos para protección del operador y del ambiente

En los laboratorios de investigación bacteriológica y de virología, así como cuando se trabaja con citostáticos, se efectúan operaciones con materiales peligrosos para la salud, como cultivos de patógenos, virus, productos biológicos desconocidos en cultivo de tejidos, materiales cancerígenos, etc. En producción farmacéutica se trabaja con productos oncológicos, hipnóticos, etc. que demandan la protección del operador y del ambiente. Para el trabajo con estos productos son imprescindibles los equipos de seguridad biológica definidos según sean para la protección del operador y del ambiente del laboratorio solamente, o también para preservar al producto o cultivo del contaminante ambiental, manteniéndose entonces un doble compromiso. Hay que considerar el hecho de que en un 30% de los casos las causas de las infecciones adquiridas son desconocidas en cuanto al medio de transmisión. Las infecciones por causas conocidas son en su mayoría originadas por accidentes que son consecuencia de alguna forma de contacto directo, como inoculación o ingestión. Más difícil es reconocer las causas originadas por aerosoles patógenos generados por pipeteo, transvasado, centrifugación y manipulación

de cultivos. El reconocimiento del peligro de las enfermedades e infecciones adquiridas en el laboratorio ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos, procedimientos y equipos para llevar a un mínimo la exposición del operador a agentes infecciosos conocidos o potencialmente peligrosos.

Con el desarrollo de la ingeniería genética y los laboratorios de bioingeniería y ADN recombinantes, la necesidad de equipos confiables de bioseguridad se ha incrementado al máximo en especial en laboratorios donde se trabaja con agentes exóticos. La necesidad de aislación de los mismos con el ambiente exterior ha llevado al equipamiento de bioseguridad a cumplir con condiciones extremas. Sin ir más lejos, en nuestro país la erradicación de la fiebre aftosa hace que los laboratorios donde se trabaja con dicho virus sean sometidos a exigencias máximas. En casos de precauciones extremas se instalan dos filtros HEPA en serie, evitándose el riesgo potencial de pérdidas por uno de ellos, en la extracción del aire desde el laboratorio hacia exterior.

Actualmente se fabrican filtros ULPA (*Ultra Low Penetration*) definidos con eficiencias del 99.999% y 99.9999% en 0,12 μ . – o MPPS. Se ha verificado que el aerosol de mayor penetración no es como se creía de 0,3 sino de 0,12 μ a 0,18 μ , pero las diferencias de penetración no son substanciales, razón por la cual sigue utilizándose la vieja definición de filtro HEPA. La selección de equipos por sus clases I, II y III se hace en función de su riesgo, basándose en la monografía de NIH (*Nacional Institute of Health*) y C.D.C. (*Center for Disease control*) [2] con agentes de riesgos con niveles 1, 2, 3, y 4, siendo el nivel 1 de mínimo riesgo y el de 4 de máximo riesgo.

- Nivel de riesgo 1: Agentes biológicos de los que no se conoce como causantes de enfermedades en adultos sanos. No se requiere generalmente equipos de seguridad biológica.
- Nivel de riesgo 2: Agentes asociados con enfermedades humanas. Peligrosas por: autoinoculación, ingestión, mucosas. Prácticas: Uso de equipos de seguridad biológica clase I o clase II.
- Nivel de riesgo 3: Agentes biológicos locales o exóticos con posibilidad de contaminar por transmisión por aerosoles enfermedades que pueden tener consecuencias graves.
- Nivel de riesgo 4: Agentes extremadamente peligrosos y/o exóticos, infecciones que pueden transmitirse por aerosoles. En la práctica se utilizan únicamente equipos de seguridad Clase III (cajas de guantes) con cuidados extremos con el personal, incluyendo a veces ropas con escafandras con presión positiva. Se requiere esterilización de todos los residuos por autoclave o incineración y cambios de ropas esterilizadas.

El ambiente de laboratorio de bioseguridad

A diferencia de las áreas limpias utilizadas para llenado aséptico en la industria farmacéutica, que se encuentran en zonas con inyección de aire por filtro HEPA y presión positiva para evitar la posibilidad de entrada de contaminantes; donde se trabaje con patógenos se deberá estar con presión negativa.

La idea fundamental es que en toda operación, sea de manipuleo, transvasado, agitación, centrifugación o pipeteo, habrá una generación de aerosoles.

Cuando se trate de patógenos, deberá evitarse la posibilidad de su salida al exterior por el riesgo que ello implica. Para ello el gabinete de seguridad biológica, que llamaremos de primera barrera, deberá ser instalado en ambiente de laboratorio que llamaremos de barrera secundaria. Dichos ambientes como habíamos mencionado previamente, amén de presentar superficies lisas en paredes y pisos (con zócalos redondeados) que faciliten su limpieza y desinfección, deberán tener una extracción de aire a través de filtros HEPA, tal que produzca presión negativa en el ambiente. Se evitará el escape al exterior de aerosoles en caso de algunas aperturas, accidentes o pérdidas (Figura 25).

La mayoría de los gabinetes de seguridad biológica fueron utilizados para aislar al experimento del investigador [5]. Los equipos de aislación de áreas limitadas construidos fueron llamados Clase I, II y III por los laboratorios biológicos del ejército de las EEUU, establecidos en Fort Detrick, los que hicieron la mayor parte del trabajo de desarrollo de estos equipos llamados inicialmente LFBSC (*Laminar Flow Biological Safety Cabinets*)

Figura 25.

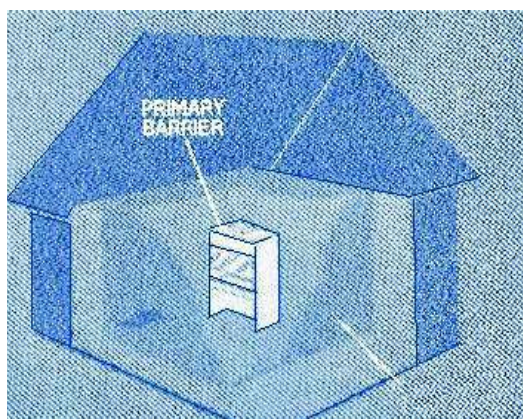
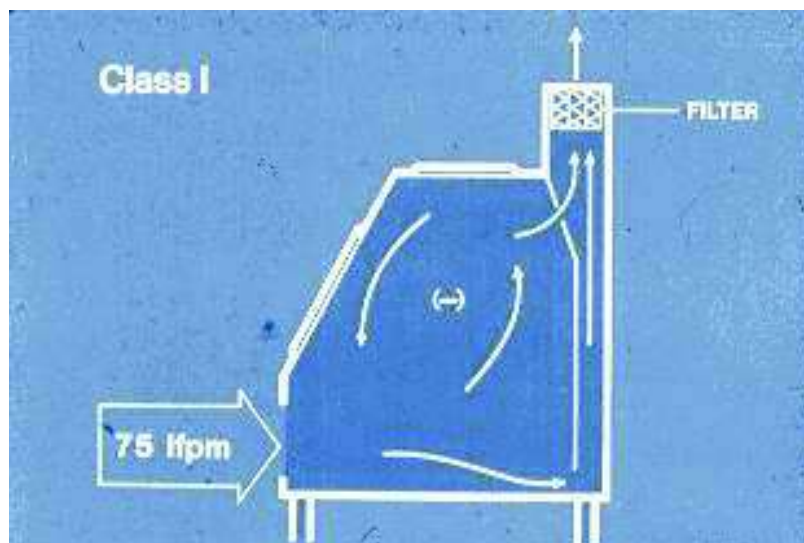


Figura 26.



Figura 27.



Equipos clase I

Los gabinetes de seguridad Clase I son básicamente campanas de extracción de acero inoxidable que usan un caudal de aire que se dirige del ambiente hacia la mesa de trabajo y de allí a un extractor con filtro HEPA, de manera de evitar la salida de aerosoles al ambiente del laboratorio.

La mayor desventaja del gabinete Clase I es que los materiales en experimentación son expuestos a los contaminantes ambientales que entran al gabinete con el aire ambiente. Más aún, el hecho de que el régimen de desplazamiento del aire sea turbulento, hace posible la contaminación cruzada dentro del gabinete (Figuras 26 y 27).

Los gabinetes Clase I son de seguridad parcial para trabajos con agentes de riesgo bajo o moderado, donde hay una necesidad de aislación para el ambiente y el operador pero no para el producto. Permitásenos subrayar una vez más que el gabinete no aísla a los cultivos y materiales en experimentación de los contaminantes del aire ambiente del laboratorio. La mayor diferencia entre los equipamientos Clase I y las campanas de extracción de humos se debe al filtro HEPA, que es el elemento fundamental para evitar el escape de aerosoles al ambiente. La protección del personal se hace posible por el movimiento constante de aire desde el operador hacia el gabinete.

Como se muestra en el esquema de la figura 28, el flujo controlado de aire en el área de trabajo evita la salida de los contaminantes por la abertura frontal dando protección al personal. Siendo el flujo de aire inducido por un

motoventilador centrífugo que extrae el aire del gabinete, se genera una presión negativa dentro del mismo, evitando la salida del aire contaminado hacia el ambiente exterior.

A continuación del filtro HEPA puede tener en la extracción, un filtro de carbón activado para la eliminación de gases contaminantes que no son eliminados por el primero (figura 29).

Figura 28: Cabina Clase I



Figura 29: Cabina Clase I con filtro de Carbón activado



Equipos Clase II

Es de extrema importancia considerar dentro de los equipos de seguridad biológica los equipos Clase II. *Flujo vertical* En estos se combinan dos necesidades o características: se protege al producto del operador y del ambiente. Y se protege al operador y al ambiente del producto.

El equipo Clase II es de flujo laminar vertical pero el porcentaje del aire se recircula dentro del gabinete extrayéndose el resto por un filtro HEPA. La cantidad de aire extraído es equivalente al caudal de aire de entrada en forma de cortina que aísla el ambiente del gabinete del ambiente exterior. Una de las diferencias fundamentales del equipo de seguridad biológica Clase II vs. los equipos comunes de flujo laminar, es que éstos (sean de flujo horizontal o vertical) no aíslan de ningún modo al ambiente del laboratorio de los aerosoles generados por el producto que los impulsa por la corriente de aire estéril.

Si bien todos los equipos de seguridad biológica Clase II son de flujo laminar vertical, la inversa no es necesariamente cierta.

Hay equipos de flujo laminar vertical para protección del producto que no protegen ni al operador ni al ambiente como se muestra en la figura 30. NO SON CLASE II.

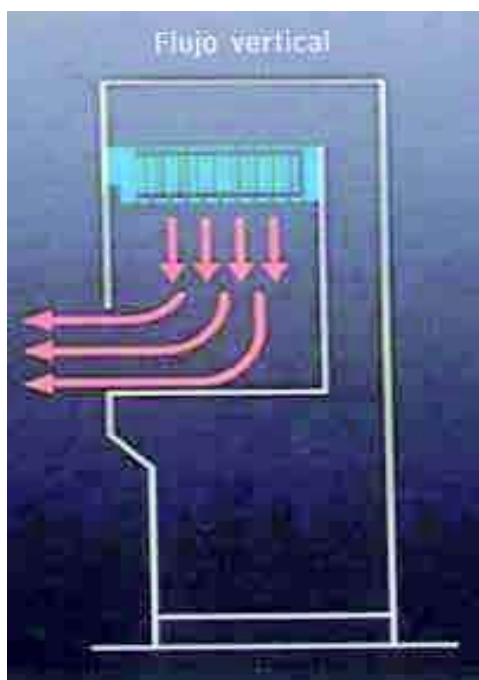


Figura 30

Gabinetes de seguridad biológica Clase II

Tipos de gabinetes

Desde el desarrollo de los primeros gabinetes Clase II, las modificaciones en los diseños ha llevado a la designación de varios tipos de los mismos. Esta clasificación ha originado una cierta confusión entre los usuarios, que trataremos de disipar en forma simple a continuación.

Es importante para el usuario seleccionar adecuadamente el gabinete, y especificar lo que corresponde para su compra o licitación, y que sepa elegir el equipo más adecuado para su trabajo. De allí la importancia del conocimiento de las distintas alternativas. Como ejemplo de la confusión, siendo los equipos de seguridad biológica Clase II de flujo vertical, en varias oportunidades se han hecho especificaciones en donde lo único que se menciona es "gabinetes de flujo laminar vertical", sin dar las características y especificaciones de los equipos Clase II que tienen normas reconocidas internacionalmente como las NIH 03/112 y la NSF 49 [4]. Errores groseros, como el mencionado anteriormente, han resultado en la aplicación de gabinetes de flujo laminar común sin ninguna protección para el operador ni para el ambiente. En ese caso el flujo de aire se transforma en el vehículo de los aerosoles patógenos hacia el exterior del mismo.

Todos los equipos Clase II tienen en común la succión por una reja perforada que induce una cortina de aire, impidiendo la entrada o salida de aerosoles por la abertura frontal del equipo. La abertura frontal es de aproximadamente de 20 cm a lo largo de la mesa de trabajo. Las grandes diferencias entre estos equipos consisten en el porcentaje de aire recirculado y el aire de extracción.

La más práctica y entendible clasificación de los gabinetes Clase II es la que se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de gabinetes de Clase II.

NSF Nueva Clasificación ,Adoptada 2002	NSF Clasificación Previa	Descripción General
A1	Clase II Tipo A	70% aire recircula; 30% aire extraído de un pleno común al ambiente del laboratorio 75 FPM cortina de aire de entrada (22,5 m/min) - Pleno contaminado biológicamente bajo presión positiva
A2	Clase II Tipo A/B3	70% aire recircula, 30% aire extraído de un pleno común al ambiente del laboratorio 100 FPM cortina de aire de entrada (30m/min) - Pleno contaminado biológicamente bajo presión negativa, o circundado por presión negativa
A2	Clase II Tipo B3	70% aire recircula, 30% aire extraído de un pleno común a un sistema de extracción del edificio al exterior 100 FPM cortina de aire de entrada (30m/min) - Pleno contaminado biológicamente bajo presión negativa o circundado por zonas de presión negativa
B1	Clase II Tipo B1	40% aire recircula, 60% extraído del gabinete - Aire extraído llevado a un ducto de extracción al exterior del edificio 100 FPM cortina de aire de entrada (30 m/min) - Pleno biológicamente contaminado está bajo presión negativa o circundado por zonas con presión negativa
B2	Clase II Tipo B2	0% aire de recirculación, 100% aire se extrae del gabinete - Aire de extracción se expulsa a través de un ducto al exterior del edificio 100 FPM cortina de aire de entrada (30 m/min) - Todos los ductos y plenos están bajo presión negativa - Todos los ductos contaminados están bajo presión negativa o circundados por ductos de extracción, o plenos bajo presión negativa

En casos de generación de gases y vapores que no son retenidos por el filtro HEPA será necesario que la recirculación del aire sea mínima o nula, porque de lo contrario aumentará la concentración gaseosa en la zona de trabajo. Por otro lado también es importante definir la salida del aire de extracción. Cuando se generan vapores o gases es necesario que el filtro de extracción esté conectado al exterior del edificio por conductos, para no contaminar el ambiente del laboratorio.

Los equipos tipo A pueden estar conectados al exterior del edificio o tener la extracción al ambiente del laboratorio. En cambio, todos los equipos tipo B tienen extracción al exterior del edificio.

Extracción vs. Recirculación

Las mayores diferencias entre el tipo A, el tipo B y los gabinetes 100% extracción se deben al porcentaje de aire que es extraído o recirculado, y la manera en la cual el aire de extracción sale de la zona de trabajo. La Tabla 5 da una explicación. El gabinete tipo A tiene un 70% de aire en recirculación constante, mientras un 30% es extraído del gabinete por medio de un pleno común. En el tipo B1 30% del aire es recirculado y 70% es extraído directamente fuera de la zona de trabajo a través del ducto al exterior. Finalmente en los gabinetes B2 hay 100% extracción y no hay recirculación, todo el aire es extraído directamente del área de trabajo hacia fuera del gabinete.

Gabinetes Clase II – Tipos A1 y A2

En los gabinetes Clase II Tipo A1, tales como Sterilgard (Figura 31), 30% del aire se extrae del filtro HEPA de extracción mientras el restante 70% se recircula a través del filtro HEPA de inyección al área de trabajo. Las figuras muestran la cortina de aire inducida, la que impulsada luego por el ventilador se bifurca en aire en flujo laminar sobre la mesa de trabajo, mientras que el resto es extraído por el filtro HEPA. La salida de patógenos es evitada en la parte del frente del equipo por la cortina de aire, la que al mismo tiempo evita la entrada de aire contaminado a la zona de trabajo. En ambos equipos el volumen total es impulsado por el motoventilador al pleno. En el mismo, el aire se bifurca evacuándose un 30% a través del filtro HEPA de salida, entrando nuevamente al aire ambiente libre de partículas en el modelo A1, o expulsado al exterior del edificio por medio de conductos en el A2. El restante 70% del aire es impulsado a través del filtro HEPA de inyección y entra al área de trabajo estérilmente en régimen laminar.



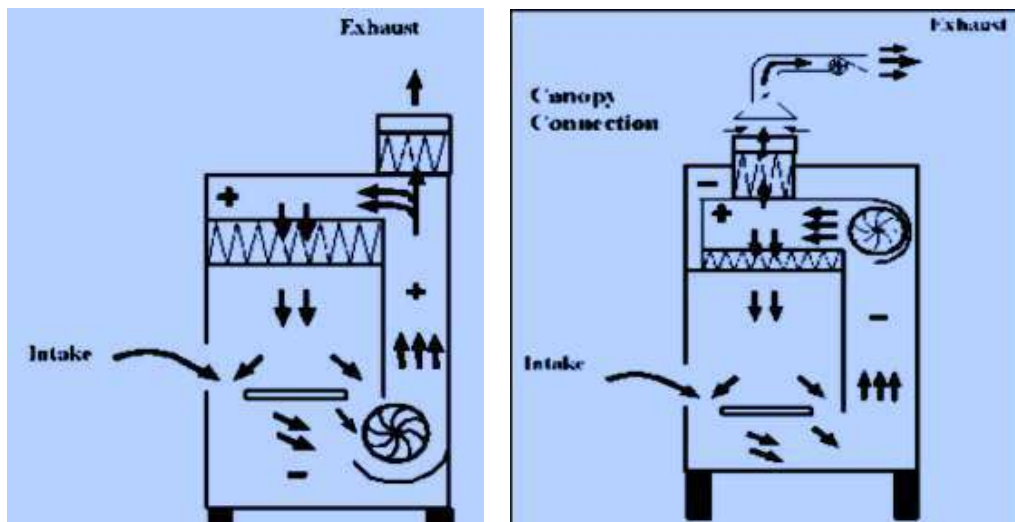
Figura 31 Gabinete clase II tipo A1.

Los equipos Tipo A2 pueden tener la extracción del aire a través del filtro HEPA de salida al interior del laboratorio o al exterior. Esto se indica en la Figura 32, donde se ven ambos casos. El esquema de la izquierda muestra un equipo con salida al interior del laboratorio mientras que el de la derecha muestra el mismo equipo con el filtro de salida conectado a una transición que lo une al conducto hacia el exterior

La velocidad de la cortina de aire inducida por el ventilador es 75 FPM (pies/ min) equivalente a 22,50 m/ min en A1 mientras que en A2 la velocidad de la cortina de aire es de 100 FPM (pies/ min) equivalente a 30 m/ min. Mientras en A1 el pleno contaminado está bajo presión positiva en A2 el pleno está bajo presión negativa, o rodeado bajo presión negativa.

Estos gabinetes no admiten trabajos con generación de gases o vapores, pues siendo la recirculación del aire del 70% estos se acumularían llegando a situaciones peligrosas.

Figura 32: Gabinete con salida al laboratorio (izquierda) y con salida al exterior (derecha)



Equipos clase II- Tipo B1

El gabinete Tipo B1 clásico extrae el 70% del aire, recirculando solamente el 30% del mismo. Su diseño obedece a evitar la acumulación de gases o vapores al extraerse al exterior del edificio el 70% del aire de entrada. La velocidad de la cortina de aire de entrada es de 100 FPM (30m/ min) Además este gabinete incluye en su diseño tres elementos particulares, a saber:

1. Todo el aire de extracción es tomado directamente de la zona de trabajo y llevado por medio de un conducto al sistema de extracción central del edificio al exterior mediante un ventilador centrífugo situado en el techo.
2. El 30% del aire recirculado es filtrado a través de un filtro HEPA inmediatamente debajo de la superficie de trabajo antes de ser recirculado.
3. Todo el aire no filtrado fluye al gabinete bajo presión negativa. Todas las áreas de presión positiva están libres de inyección. Aclara la descripción anterior el diagrama que se muestra en la figura 33, la que ilustra un corte de un gabinete Tipo B1

Equipo Clase II – Tipo B2

El segundo tipo de los gabinetes Clase II tipo B es de 100% de extracción total, como se ve en la figura 29. Este tipo de gabinete es ampliamente utilizado en toxicología y en aplicaciones similares, en las cuales efluentes con productos químicos en fase gaseosa se encuentran presentes, pero el aire debe mantenerse en condiciones extremas de limpieza en cuanto a partículas.

Como su nombre lo indica el 100% del caudal de aire que pasa a través del gabinete va al exterior o donde el aire no origine riesgos. No hay recirculación del aire dentro del gabinete.

El diagrama de la figura muestra una vista del gabinete mencionado. El aire entra al gabinete por medio de un motoventilador y pasa a través de un filtro HEPA al área de trabajo en régimen laminar vertical. El aire descende hasta la mesa de trabajo de donde sale a un sistema separado de extracción para el tratamiento apropiado. Simultáneamente el aire que entra al gabinete por la reja perforada del frente es inmediatamente llevado al sistema de extracción. Todos los conductos contaminados se encuentran bajo presión negativa.

Gabinetes Clase II – Tipo B3

Según la nueva Clasificación de la NSF (*Nacional Sanitation Foundation*) NSF 49 del 2002 este equipo ha sido substituido por el A2

Figura 33: Gabinete tipo B1

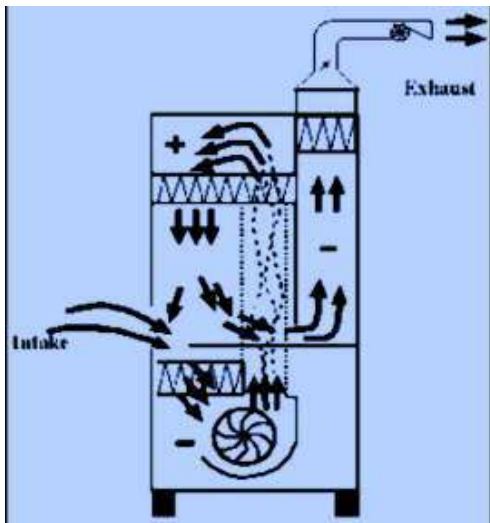
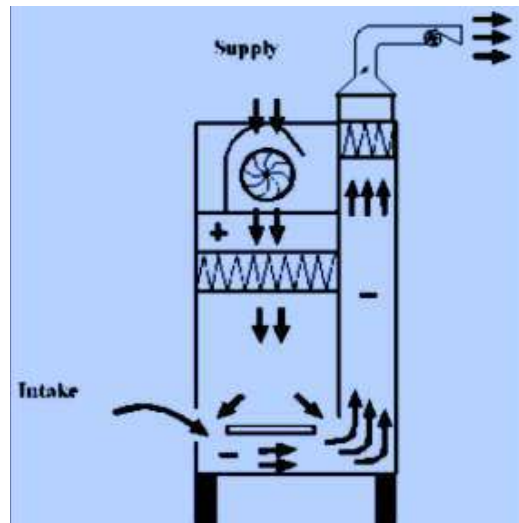


Figura 34: Gabinete Clase II Tipo B2



Uso de los gabinetes de seguridad biológica Clase II

Recordamos que los gabinetes de seguridad biológica Clase II se diseñaron para evitar el escape de patógenos de la zona de trabajo al ambiente del operador, así como para mantener el material y los cultivos libres de la contaminación ambiental. Estos equipos son un elemento importantísimo en la mayoría de los experimentos con material biológico. La salida de patógenos al exterior de la mesa de trabajo es evitada por la cortina de aire que circula por la abertura frontal hacia la reja perforada perimetral de la mesada y por la acción del filtro HEPA de extracción. La cantidad de aire que entra por la reja de entrada es igual a la cantidad de aire extraída a través del filtro HEPA de salida. La contaminación del área de trabajo, por otro lado es evitada por la acción del flujo laminar originado en el filtro de inyección. El aire fluye en régimen laminar hacia la mesa de trabajo y, amén de producir un área limpia, barre los contaminantes generados por la actividad dentro del gabinete. El aire continúa su recirculación por el ventilador hacia el pleno. Los aerosoles se eliminan por los filtros HEPA a medida que el aire retorna hacia la zona de trabajo.

Para utilizar adecuadamente este equipamiento es fundamental el manejo óptimo de los materiales, y minimizar la actividad por una estudiada secuencia de operaciones, procurando eliminar todo movimiento innecesario, para bajar a un mínimo las turbulencias y generación de aerosoles.

Es fundamental evitar obstruir la reja perforada de entrada con cualquier tipo de material.

Certificación

El primer paso al instalarse un equipo de Seguridad Biológica Clase II, consiste en certificarlo, ya sea en cuanto a la integridad del gabinete y su estanqueidad, así como en el ensayo de integridad y la eventual reparación en caso de que hubiera pérdidas de los filtros HEPA. Además debe medirse la uniformidad de flujo de aire.

Preparación de procedimientos: Idealmente deberá hacerse una lista de procedimientos a seguir con una adecuada hoja de ruta, anticipándose los movimientos de materiales, equipos y procesos hasta cumplir con la tarea asignada.

Una vez completada la lista de trabajos se comienza la operación prendiéndose las luces, poniendo en marcha el ventilador, chequeando que las rejillas perforadas estén sin obstrucciones y permitiendo el funcionamiento del equipo por unos 15 minutos.

Algunos gabinetes están equipados con lámparas ultravioletas que deben apagarse cuando el personal del laboratorio está ocupando el mismo. La acción bactericida de las lámparas ultravioletas se efectúa cuando el gabinete está fuera de operación, aunque se considera de la mayor importancia la desinfección de las

superficies interiores del mismo por lavado de éstas con una solución de alcohol al 70%.

Los operadores deben lavarse cuidadosamente manos y brazos antes y después del trabajo en el gabinete. Se recomienda además que los operadores utilicen guantes de goma con los puños del delantal de mangas largas, ceñidos a las muñecas. No se aconseja el uso de delantales de algodón, sino los de fibra sintética. Lo antedicho baja a un mínimo el peligro de que la flora de la piel contamine el área de trabajo y protege manos y brazos de la contaminación de agentes peligrosos.

Resumiendo, los procedimientos de preparación de los gabinetes de seguridad biológica, tendremos que considerar:

1. Certificación de integridad de los filtros HEPA, balance de la cortina de aire, verificación de la velocidad de desplazamiento del aire y certificación de estanqueidad del gabinete.
2. La preparación de los procedimientos y la hoja de ruta para minimizar los movimientos son fundamentales para una buena disposición de los materiales y productos a ser usados en la experiencia.
3. El procedimiento de puesta en marcha consiste en prender las luces, verificar que las rejillas de aire de entrada y extracción no estén obstruidas y la puesta en marcha del ventilador. Deberá permitirse operar al ventilador por un mínimo de 5 minutos antes de dar comienzo a las operaciones dentro del gabinete.
4. Una vez colocados materiales y productos dentro del gabinete sin que ninguno de estos obstruya el paso de aire generando turbulencias sobre los elementos críticos, y disponiéndolos de manera tal que las operaciones planeadas previamente se puedan hacer con comodidad, se dejará el gabinete en funcionamiento por alrededor de 5 minutos para permitir la eliminación de aerosoles que pudieran encontrarse dentro del mismo.
5. Es importante que se disminuyan a un mínimo los movimientos del personal y equipos en las cercanías del gabinete, así como la posibilidad de corrientes de aire provocadas por las puertas y ventanas abiertas. Es recomendable que tanto los equipos Clase II como los equipos de Flujo Laminar común estén dispuestos en zonas del laboratorio lo más alejadas posibles de las puertas de acceso y del movimiento del personal.
6. Todo movimiento es nocivo tanto dentro del gabinete como para la cortina de aire del mismo, por lo que tanto se insiste en el planeamiento adecuado para evitar movimientos innecesarios. Cada vez que brazos o manos se introducen con material al gabinete existe peligro de escape o entrada de aerosoles, lo que se evita con movimientos muy lentos y pausados del operador. La norma 49 de la *National Sanitation Foundation* N.S.F. especifica velocidades de la cortina de aire de 0,5 ms/ seg. (0,55pies/ min) para los equipos A2, B1, B2, Asimismo se recomienda una altura de la apertura por donde se introducen las manos de no más de 20 cm (8").
7. Finalmente en la figura 35 se ve una fotografía tomada en los laboratorios de microbiología de The Baker Co., donde se certifica la eficiencia de la cortina de aire de un equipo Clase II. Para ello un tubo de acero introducido en el gabinete simula la acción de un brazo del operador, mientras dos tomadores de muestras biológicas ubicados en el exterior, verifican que no haya salida de aerosoles generados en el interior del gabinete. Al mismo tiempo, placas de Petri ubicadas en el interior, verifican la falta de penetración de aerosoles portadores de microorganismos provenientes del exterior.

Figura 35: Certificación de la cortina de aire.



Gabinetes de alta seguridad Clase III

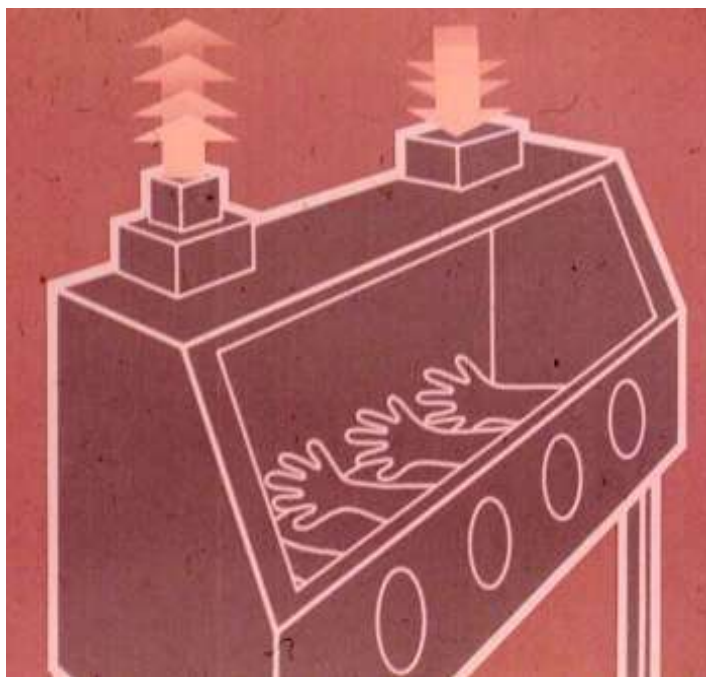


Figura 36: Gabinete de seguridad Clase III

Los gabinetes Clase III, originariamente llamados “cajas de guantes” por sus características constructivas, son gabinetes herméticos en los que el trabajo se efectúa por medio de guantes. Tienen filtros HEPA de inyección y de extracción en régimen turbulento (Figura 36).

El ambiente interior del gabinete se encuentra con una presión negativa con respecto al ambiente exterior de 12,5 mm de columna de agua, para prevenir el escape de aerosoles en caso de que hubiera una fisura accidental.

Se utilizan típicamente para trabajos con cultivos de agentes patógenos de alto riesgo o con virus exóticos, entre ellos: Fiebres Hemorrágicas, Lasa, Ebola y Agentes Infecciosos clasificados como clase 4 por el CDC (Center for Disease Control, Office of Biosafety).

Los gabinetes Clase III proveen una barrera física total entre ambientes y operador. Se utilizan actualmente no sólo en la prevención de la contaminación del operador y del ambiente, sino también como aisladores para llenado aséptico de productos farmacéuticos. En este último caso, tratándose de llenado estéril de productos farmacéuticos la presión interior es negativa o positiva dependiendo de si debe mantenerse el ambiente de producción libre de polvo que se procesa o si se aísla una llenadora de líquidos inyectables. La manipulación de los elementos en el interior del gabinete se hace por medio de guantes lo que hace imposible la contaminación por contacto.

Los sistemas Clase III son imprescindibles en el control de contaminantes de alto riesgo y los generados por manipuleo, pesaje y dilución de carcinógenos químicos. También es necesaria su aplicación cuando se trabaja con altas concentraciones de agentes de riesgo moderado o riesgo desconocido.

Los sistemas Clase III cumplen con la máxima seguridad, el doble compromiso de salvaguardar el producto del contaminante exterior, y al exterior del producto, evitándose la contaminación del ambiente de laboratorio y del personal. Un sistema de Clase III puede ser construido para aislar incubadoras, congeladoras centrifugas y otros materiales de investigación.

Autoclaves de doble puerta se conectan a los sistemas para la esterilización de productos, tanto al introducirse o al extraerse del sistema.

Debe ponerse especial cuidado en el control periódico de la integridad de los filtros HEPA y su eventual sellado, así como el control de la hermeticidad de los gabinetes. Es práctica común la utilización en la extracción de dos filtros HEPA en serie, uno en el gabinete y otro en el conducto de extracción.

Como se mencionó anteriormente, los equipos Clase III se están usando en la industria farmacéutica para la aislación de procesos de fraccionamiento o envasado estéril. En otras palabras, se lo utiliza con el nombre de "Isolators" (aisladores) en procesos de producción aséptica.

Figura 37: Aislador para muestreo de drogas potentes



La Figura 37 muestra una línea de llenado aséptico de líquidos inyectables estériles. Aunque el trabajo por medio de guantes es relativamente incomodo, la mayor ventaja de estos equipos es que se hace prácticamente imposible la contaminación por contacto. Por otro lado, no habiendo introducción de posibles contaminantes, la circulación del aire por filtros HEPA en régimen no laminar es suficiente, manteniéndose la presión positiva en este caso.

La Figura 37 muestra un aislador usado en el fraccionamiento de una droga inyectable utilizada en quimioterapia. En este caso, la presión es negativa dentro del gabinete para proteger al personal y al medio ambiente del producto. Tiene agregado un túnel de entrada de viales bajo radiación UV y válida para abertura de los viales ya llenados y cerrados.

Bibliografía.

1. Langmuir. Washington Office Technical Service OSD Report 865. 1942
2. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* CDC-NIH. US. National Institute of Health. Department of Health and Human Services
3. *Clean Room Design*. W. Whyte
4. NSF National Sanitation Foundation Standard 49
5. *Safe use of Biological safety cabinets or The case of contaminated cultures*. Eagleson Institute Portland Maine
6. IES Institute of Environmental Sciences Standards
7. ISO 14644 Standards
8. National Air Filtration Association (NAFA) Filter guide
9. *El filtrado del aire en la industria farmacéutica*. Mino Covo

Aguas para Aplicaciones Farmacéuticas

Carlos Chiesa

- *Introducción - Requerimientos generales*
- *Tipos de agua*
- *Control microbiológico*
- *Carbono Orgánico Total (TOC)*
- *Minimización de efluentes*
- *Diseño para el éxito*
- *Aplicaciones futuras. PAT*
- *Especificaciones de la calidad del agua*
- *Métodos de purificación de aguas*
- *Características de los materiales*
- *Sistemas de sanitización y control de la carga microbiológica*
- *Requisitos de los tanques de almacenamiento*
- *Requisitos de los sistemas de distribución*
- *Metodologías para el control de la contaminación microbiológica*
- *Calificación y validación de sistemas de agua. Sistemas nuevos. Sistemas existentes*
- *Documentación para las calificaciones / validaciones*
- *Seguimiento del sistema*
- *Mantenimiento y revisiones del sistema de agua*
- *Bibliografía*

Introducción

La elaboración de productos farmacéuticos, como la vida misma, depende del agua. El diseño, operación, mantenimiento, validación y documentación de los sistemas de agua de grado farmacéutico son fundamentales, tanto para mantener las instalaciones de elaboración de medicamentos en niveles adecuados de funcionamiento como para asegurar la calidad del producto final. En definitiva, es tanto un insumo (o materia prima) como un servicio.

El agua es la sustancia más ampliamente usada como insumo, en las formulaciones de productos farmacéuticos o procesos generales (lavado principalmente). Debido a su polaridad y puentes de hidrógeno intermoleculares, tiene características químicas que la hacen única. Es capaz de disolver, absorber, adsorber, o suspender muchos compuestos diferentes. Esto incluye a contaminantes que pueden ser perjudiciales en sí mismos o

reaccionar con otras sustancias resultando en riesgo para la salud.

Desafortunadamente, los sistemas mal mantenidos y/o pobremente operados ocupan un lugar preponderante en las listas de problemas enunciados por autoridades regulatorias internacionales tales como EMEA, FDA, TGA, entre otras.

Mantenimiento y operación no quiere decir "configurar, poner en marcha y olvidarse" de las actividades cotidianas. Permanentemente se requieren ajustes en el proceso y el mantenimiento del sistema. *"Dado que el agua es un elemento imprescindible y fundamental, las firmas deben verificar que cuenten con un sistema cuyo diseño es el adecuado a sus necesidades"*.

Considerando lo anterior, podemos afirmar que no existe un modelo único para el diseño, operación o mantenimiento que equipare todos los requisitos. Por lo tanto la elección del sistema correcto para cada una de las necesidades en particular es, desde ya, una tarea compleja.

Los laboratorios deben tener cuidado al confiar demasiado en los equipos diseñados y construidos "en serie" sin transmitir sus necesidades exactas. Debe tenerse en cuenta que un equipo que no ha sido diseñado según los propios requerimientos puede comprometer seriamente la eficiencia del conjunto y requerirá, seguramente, actualizaciones o cambios menores después de la puesta en marcha que pueden perjudicar el sistema en su conjunto. Los equipos estándar tienen sus pros y sus contras. Por lo general el ahorro en los costos no justifica comprometer el servicio y la calidad del agua. El diseño del equipo según las propias necesidades es prácticamente esencial.

Dependiendo de la vía de administración, se requieren diferentes grados de calidad de agua. Estos han sido identificados por las Farmacopeas de diferentes países (FA, USP, BP, entre otras) o internacionales (EP, por ejemplo). En todo momento, la mayor preocupación radica en conservar la calidad del agua en lo que hace a sus atributos fisicoquímicos y/o microbiológicos.

El agua, a diferencia de otros materiales, se toma de un sistema y se utiliza según necesidad. Tampoco está sujeta a ensayos y aprobación antes de su uso, siempre que el sistema se encuentre adecuadamente validado. Por lo anterior, es esencial poder asegurar la calidad del agua, en todos sus atributos, en el momento que vaya ser utilizada. Es bien sabido que algunos análisis microbiológicos requieren tiempos de incubación más o menos largos y los resultados se obtienen tiempo después que el agua ha sido utilizada.

Requerimientos Generales

Es fundamental que los sistemas de agua sean confiables desde todo punto de vista, para que entreguen agua de la calidad requerida en el momento que se necesita. Los sistemas de agua deben cumplir con los principios básicos de las Buenas Prácticas de Manufactura desde su diseño hasta la operación rutinaria. No deben operarse más allá de su capacidad operativa y el agua debe ser producida, almacenada y distribuida de forma de prevenir cualquier tipo de contaminación microbiana, química y/o física (con partículas de polvo, por ejemplo).

Dado que el desempeño de los sistemas de tratamiento de agua depende básicamente de aquella que ingresa al sistema (ya sea del suministro público o tomada de fuentes propias) debe ser monitoreada regularmente para verificar que los parámetros establecidos se mantienen constantes o que se tomen las acciones necesarias en caso que se excedan los límites. Los registros de los valores encontrados y de las acciones tomadas en cada caso deberán conservarse por tiempos más o menos prolongados según se establezca en los respectivos procedimientos.

Por otro lado, los sistemas de generación, almacenamiento y distribución deben ser controlados en sus atributos de calidad y de funcionalidad para demostrar en todo momento que el agua utilizada en procesos farmacéuticos cumple con los parámetros establecidos.

Además, un sistema de calidad moderno debería evaluar los resultados del seguimiento no solamente por los valores individuales que se van obteniendo sino, y quizás lo más importante, por las tendencias que muestren esos atributos. Una rigurosa evaluación no solamente permitirá mantener al sistema dentro de las especificaciones sino que permitirá conocer las verdaderas capacidades del mismo en términos de productividad y conservación de sus parámetros.

Tipos de agua

Si bien hay diferentes tipos de agua que se utilizan en los diversos procesos de la industria farmacéutica, básicamente se puede hablar de los que se indican a continuación: **Agua Purificada (PW de “Purified Water”)**, **Agua Altamente Purificada (HPW de “Highly Purified Water”)** y **Agua para Inyectables (WFI de “Water for Injections”)**.

Las especificaciones y aplicaciones de los diferentes tipos de agua se pueden encontrar en las diversas farmacopeas (FA, BP, EP, USP). Los procesos de purificación consisten, principalmente en reducir la carga de material orgánico (TOC) e inorgánico (conductividad) además de reducir la carga microbiológica y de endotoxinas (en el caso de Agua para Inyectables).

Control microbiológico

La contaminación microbiológica es una gran preocupación en el agua de aplicaciones farmacéuticas. La presencia de microorganismos, incluyendo bacterias y sus endotoxinas es inevitable. Los microbios se encuentran en todos los sistemas de agua, y son impredecibles. Es muy difícil controlar la contaminación dado que un número importante de factores (temperatura, pH, velocidad, calidad del medio ambiente, el cuidado en las operaciones, entre otros) pueden intervenir en la proliferación de microorganismos con la consecuente contaminación del sistema. Puede darse que dos sistemas idénticos tengan comportamientos distintos sólo porque el entorno no es el mismo.

El elemento que se utiliza con mayor frecuencia para controlar el crecimiento bacteriano es el calor. Manteniendo la temperatura del agua por encima de 80 °C se va a lograr la reducción prácticamente total de los microorganismos.

El tratamiento con ozono, que empezó a usarse a principios de 1990, también puede utilizarse, pero su uso no se extendió debido a que las mezclas no resultaron del todo eficientes. Por otro lado, el ozono puede llegar a corroer sellos y juntas si no se maneja cuidadosamente. Se ha comprobado que el ozono contribuye a mantener los sistemas de agua significativamente limpios, por lo tanto puede utilizarse como sanitizante pero debe procederse luego a su eliminación total con luz ultravioleta de 254 nm con verificación de esta remoción antes de utilizar el agua en cualquier proceso productivo.

Las técnicas actualmente más utilizadas para obtener agua para procesos farmacéuticos incluyen la ósmosis inversa (RO), que puede o no estar asociada a la electrodeionización y la destilación. Además, es importante que los tanques sean construidos en Acero Inoxidable 316 L (aleación que incluye cromo / níquel / molibdeno), debido a la inercia que presenta este material frente al calor y a los diferentes productos químicos y/o métodos utilizados en la desinfección.

La mayoría de las bacterias en los sistemas de agua existen formando delgadas películas que se adhieren a las superficies de los equipos, tanques o cañerías. Estas películas se denominan “*biofilms*”. Estos se pueden encontrar en prácticamente cualquier superficie, donde el medio ambiente proporciona la humedad suficiente.

Dado que, es altamente improbable que los contaminantes se distribuyan uniformemente en todo el sistema una muestra tomada en un momento dado puede no ser representativa del nivel real de contaminación en el sistema.

Se puede decir que el “*biofilm*” es prácticamente una amenaza permanente en todos los sistemas. Un vez que se instala, removerlo por completo es algo realmente muy difícil. Por lo tanto se debe trabajar, desde el diseño, en la prevención de la acumulación de bacterias, para que no formen esas películas, que luego aparecen y reaparecen a pesar de las sanitizaciones. El punto clave, pero de difícil logro, es prevenir la acumulación de bacterias. Con esto se podrá controlar la formación de las biopelículas.

En general los sistemas que no toleran la desinfección por calor son los más propensos a la formación de “*biofilms*” que traen como consecuencia, la aparición en forma aleatoria de contaminación microbiológica.

La eliminación incompleta de esta película de origen bacteriano solamente conducirá a que ésta vuelva a su estado de equilibrio y se desarrolle nuevamente. Para destruir este desagradable habitante de los sistemas de agua se utilizan tratamientos químicos tales como el ozono, el cloro, el dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y el hidróxido de sodio. Sin embargo, todo lo que se agregue al sistema luego debe ser retirado y, de una forma u otra debe quedar evidencia de esta remoción.

Los tratamientos físicos de sanitización incluyen la recirculación de agua caliente (80 °C o más) durante tiempos establecidos, limpieza mecánica por raspado y sistemas de rociado de agua a alta presión.

Los sistemas de agua a temperatura ambiente requieren que todos sus componentes sean sanitizados. Si bien estos procesos son más importantes en la medida que nos acercamos al final del sistema, no hay que olvidarse del comienzo del mismo, que suele ser en la mayoría de los casos la fuente del problema a mediano o largo plazo.

No existe una prohibición formal respecto del uso de filtros (de profundidad o de membrana), sin embargo estos elementos no son aceptados como el único sistema para la "limpieza" microbiológica del agua. Es importante señalar que los filtros constituyen una "barrera" que retiene los microorganismos. Si se produjera una falla o un inadecuado manejo todo el volumen acumulado podría volcarse al agua generando altos niveles de contaminación. Desde la superficie de los filtros pueden recolectarse fácilmente los microorganismos dado que son su propia fuente de nutrición, su crecimiento se acelera, mientras que el filtro les proporciona el soporte para que puedan sobrevivir.

Carbono orgánico total (*Total Organic Carbon* - TOC)

La medición de TOC es un requerimiento de varias farmacopeas (USP, EP, entre otras) para evaluar uno de los atributos de calidad del agua utilizada en la elaboración de los productos farmacéuticos. Esta determinación es una medida indirecta de las moléculas orgánicas presentes el agua, expresada en carbono.

Se ha establecido que los orígenes probables de estas moléculas sean: desde la fuente misma, las diferentes etapas de purificación, los materiales del sistema de distribución y/o de los "*biofilms*" que pueden crecer en el sistema.

La determinación del TOC puede hacerse "en línea" (con equipos que miden directamente el agua que está circulando por el sistema) o "fuera de línea" (tomando la muestra y realizando el análisis en el laboratorio).

Si la toma de las muestras se realiza adecuadamente (previniendo cualquier contaminación) el método fuera de línea puede ser más preciso. De cualquier manera no es un método instantáneo. Por otro lado, los métodos "en línea" tienen el mérito de brindar información en forma de monitoreo constante, siempre y cuando no haya interferencias químicas o errores en las lecturas de los instrumentos que pongan en peligro los beneficios de este análisis.

Minimización de efluentes

Aunque algunas empresas tratan de reintroducir el agua de rechazo que genera la ósmosis reversa, esto puede no llegar a lograrse por razones económicas. Otras empresas están utilizando el agua de rechazo, luego de ponerla en condiciones, para regadío, torres de enfriamiento, calderas o sanitarios.

La mayoría de estos sistemas se instalan y ponen en marcha a partir de una sana preocupación por el medio ambiente y un buen comportamiento.

Si hay un real interés por ahorrar agua, lo que debe hacerse es auditar el consumo de agua. Se podrán encontrar, fácilmente, áreas donde hay abuso del consumo de agua (lavaderos) o se podrá observar que el sello de una bomba sanitaria tiene una fuga, lo que ocasiona la pérdida de cientos de litros por día.

Diseño para el Éxito

El diseño de un nuevo sistema de agua farmacéutica no es un trabajo para gente sin experiencia. Hay muchos matices en estos sistemas. Las necesidades actuales de la planta y las necesidades futuras deben ser tomadas en consideración. Aún los diseños de plantas que incluyan una mayor capacidad que la necesaria puede resultar en problemas.

Las plantas que son sobrediseñadas tienden a tener largos períodos entre regeneraciones, lavados u otros eventos de mantenimiento regular, lo que permite más posibilidades para el desarrollo de "*biofilms*".

El grupo involucrado en el diseño de la planta o en eventuales mejoras debe conocer realmente los

requerimientos de la planta. Una etapa fundamental en el diseño de un sistema de agua consiste encontrar las respuestas a estas preguntas:

- ¿Cuánta agua se usa?
- ¿Qué tolerancias son necesarias para el equipo?
- ¿Qué datos deben ser recogidos?

Si no es posible encontrar las respuestas, el grupo de diseño debe proponer lo que considere adecuado y esta propuesta debe ser aprobada antes de comenzar el diseño en concreto.

No menos importante es determinar la calidad del agua que llega a la planta. Esto debe hacerse en forma estricta y en diferentes condiciones estacionales, sobre todo si se toma agua de fuentes propias sin tratamientos previos de potabilización. Deben realizarse importantes estudios de los atributos de agua “fuente” antes de comenzar el diseño de las plantas. Realmente no se conoce, a ciencia cierta, el agua que se tiene hasta que se hagan los análisis pertinentes. Por otro lado, desarrollar sistemas capaces de tratar aguas de muy disímiles características puede resultar excesivamente caro.

Aplicaciones Futuras (*Process Analytical Technologies*)

Las herramientas que se utilizan actualmente para evaluar los atributos del agua no son estrictamente Tecnologías Analíticas aplicadas a Procesos (PAT) dado que los instrumentos en línea que permiten medir TOC y conductividad no están asociados a ninguna medida de control de procesos específicos sino que se utilizan para el monitoreo y evaluación de la calidad del agua. Esto está más en línea con la denominada Liberación en Tiempo Real (*Real Time Release* – RTR) que con lo identificado como PAT.

A la fecha no existe un instrumento que evalúe el contenido microbiológico que pueda ser utilizado para RTR, el tercer elemento de la calidad del agua farmacéutica. Un dispositivo en línea que pueda medir los microorganismos es probable que cambie la industria. Este dispositivo también podría ser utilizado como base para una aplicación de PAT / RTR.

Especificaciones de la calidad del agua

Los requerimientos que se detallan a continuación están referidos al agua procesada, almacenada y distribuida en la forma “a granel”. Es decir, no es agua envasada en contenedores (ampollas, viales, frascos, entre otros) o sea no cubren los requerimientos del agua administrada a pacientes.

Agua potable

Esta debe ser suministrada bajo presión positiva continua por medio de un sistema de cañerías libre de cualquier defecto que pudiera conducir a la contaminación de cualquier producto. El agua potable se obtiene mediante el tratamiento de la que se toma de fuentes naturales o de reservorios. Las fuentes del agua natural pueden diferir y esto define el tipo de tratamiento que se le debe hacer para convertirla en apta para el consumo humano (potabilización). También es común encontrar que el agua provenga de un sistema de suministro público, que puede ser una combinación de aguas de distintas fuentes. Las empresas públicas de provisión de agua tienen la obligación de garantizar que el agua potable que entregan es de calidad “potable”.

Si el agua potable es utilizada para algún tipo de proceso (directo o de apoyo), la calidad de esta agua debe ser evaluada periódicamente para verificar que sus atributos permanecen dentro de los parámetros establecidos por las autoridades nacionales e internacionales.

Agua Purificada

Debe ser obtenida a partir de Agua Potable como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. Debe cumplir, además, con las especificaciones de las diferentes farmacopeas en lo que hace tanto a la calidad química como microbiológica. También debe ser preservada de eventuales recontaminaciones y/o

proliferación microbológica.

Agua Altamente Purificada

Debe ser obtenida a partir de Agua Potable como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. Esta especificación de calidad de agua se encuentra en la Farmacopea Europea (EP) donde se indica que debe cumplir con los mismos atributos de calidad que el **Agua para Inyectables** incluyendo el límite para endotoxinas, pero que los sistemas de tratamiento a utilizar pueden ser diferentes a la destilación. El **Agua Altamente Purificada** puede ser obtenida por diversos métodos tales como ósmosis reversa, ultrafiltración y deionización.

Agua para Inyectables

Debe ser obtenida a partir de Agua Potable como el requerimiento mínimo de calidad del agua que alimente al sistema. El Agua para Inyectables no es agua estéril y no se encuentra envasada en su contenedor final. Es un producto intermedio a granel. El Agua para Inyectables es la calidad más alta dentro de las aguas de uso farmacéutico.

Es importante destacar que algunas farmacopeas aplican ciertas restricciones al método de elaboración del Agua para Inyectables. Por ejemplo, la Farmacopea Internacional y la Farmacopea Europea sólo admiten que se utilice el método de destilación como etapa final de purificación en la obtención de este agua.

Métodos de Purificación de Aguas

Consideraciones Generales

Excepto en el caso del **Agua para Inyectables** donde la Farmacopea Internacional y la Europea requieren que se obtenga por destilación no hay indicaciones respecto del método a utilizar para obtener agua para procesos farmacéuticos. El método, o la secuencia de pasos, a seguir en la purificación del agua depende, básicamente, de la fuente de agua y de su aplicación.

Para seleccionar el método de purificación debemos considerar los elementos que se indican a continuación:

- La especificación de calidad del agua
- El rendimiento o eficiencia del sistema de purificación
- El origen del agua (su fuente) y eventuales cambios estacionales.
- La confiabilidad y robustez del equipo de tratamiento de agua durante su operación
- La disponibilidad de los equipos de tratamiento de agua en el mercado
- La capacidad de sostener y mantener adecuadamente el equipo de purificación
- Los costos de operación.

Por otro lado, las especificaciones de los equipos de purificación, almacenamiento y distribución deberían considerar lo siguiente:

- El riesgo de contaminación debido a los materiales que puedan ceder esos equipos al agua.
- El impacto adverso que pueda producir la absorción de los materiales en contacto con el agua.
- Diseño sanitario (según corresponda)
- Equipos libres de fugas
- Configuración que evite la proliferación de microorganismos.
- Tolerancia a agentes de limpieza y sanitización (físicos o químicos)

- La capacidad del sistema y los requerimientos de producción
- La provisión de todos los instrumentos necesarios y puntos de muestreo para permitir el seguimiento a lo largo de todo el sistema de los parámetros de calidad críticos.

El diseño, la configuración y la distribución de los equipos de purificación, almacenamiento y distribución debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- El espacio necesario para su instalación
- La carga estructural en los edificios
- La provisión de espacio adecuado para el mantenimiento y operación
- La posibilidad de un manejo seguro de los productos químicos usados en la regeneración y sanitización.

Producción de Agua Potable

Los procesos típicos empleados en una planta propia o por suministro público incluyen:

- ➡ Filtración
- ➡ Ablandamiento;
- ➡ Desinfección o sanitización (por ejemplo, agregando hipoclorito de sodio (cloro))
- ➡ Eliminación de Hierro (ferroso)
- ➡ Precipitación
- ➡ Reducción de materiales inorgánicos específicos / orgánicos.

Si la calidad del agua potable cambia de manera significativa, los sistemas de tratamiento aguas abajo e deben revisarse y documentar los resultados de la evaluación deben documentarse.

Donde el agua potable es almacenada y posteriormente distribuida por el usuario, el almacenamiento y los sistemas de distribución no deben permitir que el agua degrade su calidad antes de ser usada. En cualquier sistema de almacenamiento los análisis deben llevarse a cabo de forma rutinaria siguiendo un método definido.

Si se compra agua potable a granel y se transporta en recipientes, al usuario se le presentan problemas y riesgos totalmente diferentes de aquellos donde el agua es entregada por cañerías. Se deben evaluar los proveedores del agua potable y se deben controlar los envíos en la recepción como cualquier materia prima.

Los equipos y sistemas utilizados para producir agua potable deben ser capaces de ser drenados y sanitizados. Los tanques de almacenamiento deben estar cerrados con sistemas de ventilación debidamente protegidas, permitiendo la inspección visual.

Especial cuidado se debe tomar para controlar la contaminación microbiológica de filtros de arena, lechos de carbón y ablandadores de agua. Una vez que los microorganismos han infectado un sistema, la contaminación rápidamente pueden formar “*biofilms*” que se pueden extender a todo el sistema.

Producción de Agua Purificada

Al configurar un sistema para obtener Agua Purificada se debe considerar lo siguiente:

- ➡ La calidad de agua de alimentación y su variación estacional;
- ➡ La especificación de la calidad del agua;
- ➡ La secuencia necesaria de etapas de purificación;
- ➡ El consumo de energía;
- ➡ El tratamiento previo necesario para proteger la purificación final;

- Optimización del desempeño, incluyendo el rendimiento y la eficiencia de la unidad de tratamiento
- Los pasos del proceso;
- Ubicación adecuada de los puntos de muestreo diseñados de tal manera que se puedan hacer evaluaciones certeras en caso de contaminaciones;
- La unidad de proceso debe contar con instrumentos adecuados para medir parámetros tales como flujo, presión, temperatura, conductividad, pH y el carbono orgánico total (TOC);
- La temperatura ambiente. Los sistemas de Agua Purificada son especialmente susceptibles a contaminación microbiológica, sobre todo cuando el equipo no funciona durante períodos de baja o nula demanda de agua.
- Es esencial considerar los mecanismos para el control microbiológico y sanitización. Por ello se deben tener en cuenta los elementos que se indican a continuación:
 - El mantenimiento del flujo de agua a través de los equipos de purificación y en los sistemas de almacenamiento y distribución en todo momento.
 - Control de la temperatura en el sistema mediante intercambiadores de calor o enfriamiento del local donde se instala el equipo para reducir el riesgo de crecimiento microbiano;
 - Distribución con filtros de luz ultravioleta;
 - Selección de los componentes del sistema de tratamiento de agua que pueden ser térmicamente sanitizados y/o aplicación de sanitizantes químicos.

Producción de Agua Altamente Purificada

Cualquier técnica puede ser usada para obtener Agua Altamente Purificada. Típicamente se aplica: intercambio iónico, ultrafiltración u ósmosis reversa.

Producción de Agua para Inyectables

La destilación es la técnica de elección, se considera una técnica más sólida considerando el cambio de estado, y en algunos casos, la operación a altas temperaturas en los equipos. Al diseñar un sistema para obtener Agua para Inyectables, lo siguiente debe tenerse en cuenta:

- La calidad de agua de alimentación;
- La calidad y cantidad de agua necesaria;
- La capacidad del generador, que debe ser muy bien definida para evitar frecuencias altas del ciclo arranque-parada.
- Características de las purgas y las funciones de descarga,
- Las ventilaciones, para que al enfriarse el equipo se evite la entrada de eventuales contaminantes.

Sistemas de purificación, almacenamiento y distribución de agua de uso farmacéutico

Es muy importante recordar que en los sistemas de agua de uso farmacéutico (AUF) las etapas de almacenamiento y distribución deben trabajar en conjunto con la planta de purificación para asegurar la entrega constante de agua en todos los puntos de uso cumpliendo con las especificaciones establecidas. Es necesario recalcar que el sistema de almacenamiento y distribución debe ser considerado como una parte clave del sistema en su totalidad y debe diseñarse completamente integrado con los componentes del sistema de purificación del agua.

Luego de haber purificado el agua por alguno de los métodos aceptados esta puede ser usada directamente o, lo que es más común, ser dirigida a un recipiente para su posterior distribución a los diferentes puntos de uso. El sistema de almacenamiento y distribución debe ser diseñado de tal manera que prevenga, en todo lo posible, la recontaminación del agua luego de ser tratada. Por lo tanto debe prevenirse este riesgo mediante el monitoreo

constante de los atributos de calidad del agua.

Características de los Materiales

Esta sección está dedicada a describir las características que deben tener aquellos materiales de los diferentes componentes del sistema que están en contacto con el agua. Los materiales de elementos tales como cañerías, válvulas, accesorios, sellos, diafragmas e instrumentos deben seleccionarse de forma que alcancen los siguientes objetivos:

- *Compatibilidad.* Todos los materiales que se utilicen en el sistema deben ser compatibles con el mismo considerando las temperaturas de trabajo y los productos químicos que puedan llegar a usarse.
- *Prevenir la liberación de componentes solubles* por parte de los materiales que entran en contacto con el agua en el ámbito de las temperaturas de trabajo.
- *Resistencia a la corrosión.* Las diferentes aguas de uso farmacéutico presentan un alto nivel de corrosividad. Para prevenir fallas en el sistema con la consecuente contaminación del mismo los materiales deben soportar la corrosión, los métodos de unión deben ser cuidadosamente controlados y todos los accesorios y demás componentes deben ser compatibles con las cañerías utilizadas. Algunos plásticos que han sido aceptados (PVDF, por ejemplo) y el acero inoxidable (tipo 316 L o superior) son materiales típicos para estos sistemas. Para mantener la resistencia a la corrosión, es necesario que luego de completar una instalación o si se hace algún trabajo (en las de acero inoxidable) se proceda a su pasivación antes de ponerla en uso.
- *Terminaciones interiores suaves.* Una vez que el agua ha sido purificada es susceptible de contaminación microbiológica quedando el sistema sujeto a la posible formación de *biofilms* cuando se utilizan sistemas que trabajan a temperatura ambiente. La utilización de superficies interiores suaves conduce a evitar rugosidades y hendiduras o grietas dentro del sistema de aguas de uso farmacéutico. Precisamente es en las hendiduras donde la corrosión usualmente comienza. La terminación de las superficies interiores deberían tener un promedio de rugosidad (Ra) de 0,8 a 1,0 micrones. Se debe señalar que definiciones tales como pulido tipo “espejo” o “sanitario” no representan calidad alguna. La rugosidad debe medirse y deben alcanzarse los valores antes mencionados. Cuando se utiliza acero inoxidable, deben aplicarse técnicas de pulido mecánico o electropulido. Esta última metodología, por lograr superficies más suaves, mejora la resistencia del acero a la corrosión superficial.
- *Soldaduras.* Los materiales de los sistemas seleccionados deben permitir su fácil colocación mediante procedimientos de soldadura debidamente controlados. Los controles de las soldaduras comienzan con la calificación de los soldadores así como todos los elementos, materiales y equipos que se utilizan, y la documentación que dé respaldo a los trabajos realizados, además de muestras típicas de las soldaduras (probetas), registro de las soldaduras con planos de identificación y criterios de inspección visual o instrumental de acuerdo a estándares.
- *Diseño de las juntas o uniones.* Las juntas que se utilicen deben ser de diseño sanitario o higiénico (sin hendiduras ni superficies irregulares). Debe verificarse que se utilizan sellos de materiales apropiados para cada sistema en particular para lograr que estas juntas sellen adecuadamente y queden firmemente ajustadas.
- *Documentación.* Todos los componentes del sistema deben estar completamente documentados y deben estar soportados por certificados originales de cada uno de los materiales.

Sistemas de sanitización y control de la carga biológica

Los sistemas de tratamiento del agua, almacenamiento y distribución usados para la industria farmacéutica deben poseer características que les permitan controlar la proliferación de microorganismos durante la operación normal así como técnicas para la sanitización o esterilización del sistema luego de intervenciones por mantenimiento o modificaciones. Las técnicas de sanitización deben haber sido consideradas en el diseño del sistema y verificadas durante las etapas de puesta en marcha y validaciones posteriores.

Es sabido que los sistemas que operan a temperaturas en el rango de 70 a 80 °C son generalmente menos susceptibles de contaminación microbiológica que aquellos que trabajan a temperaturas menores. Si el proceso de obtención del agua o sus aplicaciones posteriores requieren que se utilicen temperaturas menores que 70 – 80 °C, deben tenerse especiales precauciones para prevenir el ingreso y proliferación de contaminantes microbiológicos.

Requisitos de los Tanques de Almacenamiento

Los tanques de almacenamiento en los sistemas de agua deben alcanzar una serie de importantes objetivos. Para su diseño así como su dimensionamiento deben considerarse los siguientes factores:

- *Capacidad.* Debe determinarse a partir de los siguientes requisitos:
 - Es necesario considerar una capacidad de amortiguación entre la generación de agua y el consumo de la misma en los diferentes puntos de uso. El tanque es el reservorio por naturaleza del sistema.
 - Para prevenir ineficiencias y problemas por el apagado y encendido de los equipos de generación de agua, el tanque debe estar incluido en subsistema de circulación de agua para permitir el funcionamiento continuo de los equipos generadores.
 - La capacidad debe ser suficiente para funcionar como reserva en caso de fallas del equipo de generación o si este se encuentra en ciclos de sanitización o mantenimiento.
 - Para definir el tamaño del tanque no sólo se deben considerar los consumos debidos a la elaboración de lotes de producto farmacéutico, sino también a aquellos consumos debidos a operaciones de lavado, esterilización, limpieza en general y demás aplicaciones que requieran agua calidad farmacéutica.
 - Para determinar el tamaño de la reserva se debe proporcionar cantidad suficiente de agua para poder completar la formulación de algún lote, una sesión de trabajo, ciclos de funcionamiento de máquinas lavadoras, autoclaves, y de cualquier otro equipo que consuma agua del tanque.
- *Control de Contaminación.* Para poder prevenir riesgos de contaminación debe tenerse en cuenta lo que se detalla:
 - El volumen entre la superficie del agua y la tapa del tanque (“espacio cabeza” --- “*head space*”) es un área de riesgo donde el agua, que se encuentra en forma de gotas entra en contacto con el aire a temperaturas que suelen fomentar la proliferación de microorganismos. Por lo tanto el diseño del tanque y del lazo de circulación debe ser configurado de forma tal que el “espacio cabeza” se encuentre todo el tiempo “mojado” por el flujo de agua. Es importante entonces, incluir las esferas de rociado “*spray balls*” que deben tener una distribución de sus aberturas tal que permita que las paredes del tanque efectivamente se mojen con el agua que ingresa al tanque.
 - Si se colocan puntos de muestreo en los tanques deben diseñarse de forma tal que no generen zonas muertas donde la contaminación puede albergarse. En todo momento debe haber circulación de agua.
 - Los filtros de venteo se colocan en los tanques para permitir la fluctuación del nivel de agua dentro del tanque. Es importante que estos filtros se mantengan secos para disminuir los riesgos de proliferación microbiana. Para ello deben ser “calefaccionados”.
 - Otro elemento que se coloca en los tanques es el filtro de ruptura, que se instala para protegerlos de sobre-presurización. Estos deben ser de diseño sanitario y deben estar adecuadamente protegidos para

evitar que una rotura externa (y no debida a sobrepresión) provoque una alteración en la integridad del sistema

Requisitos de los Sistemas de Distribución

Los sistemas modernos de distribución de Agua Purificada (AP), Agua Altamente Purificada (AAP) y Agua para Inyectables (Apl) requieren que se utilicen sistemas de distribución en lazo cerrado. En estos sistemas debe controlarse la proliferación bacteriana. No se deben instalar filtros en los lazos de distribución o en los puntos de inicio del lazo. Estos pueden llegar a ocultar contaminaciones del sistema.

- **Agua a temperatura controlada e Intercambiadores de Calor.** Cuando se utilizan Intercambiadores de Calor (IC) para calentar o enfriar dentro de un sistema de agua de uso farmacéutico se deben tomar precauciones para que este procedimiento no permita contaminar el agua. En todos los casos deben utilizarse tipos de IC aprobados por las autoridades sanitarias (FDA, por ejemplo). Es muy importante evitar en todo momento que el agua de uso farmacéutico quede estancada en el equipo. El IC debe ser parte del lazo por donde circula el agua. Normalmente es necesario reducir la temperatura del agua para poder ser utilizada en los diferentes procesos. Estos descensos de temperaturas deben ser lo más corto posible. Finalmente, los tiempos de los ciclos de enfriamiento deben ser probados adecuadamente durante la calificación del sistema.
- **Bombas impulsoras.** Son las que mueven el agua dentro del lazo de distribución. Estas deben tener un diseño sanitario (rugosidad de sus cabezales especificada y verificada) con sellos apropiados, de forma tal que impidan la contaminación del sistema. Si se poseen bombas en “stand by” estas pueden quedar fuera del lazo (secas) o configuradas dentro del lazo evitando que queden zonas muertas o agua atrapada dentro del sistema.
- **Metodologías para el control de la contaminación microbiológica.** Las más comúnmente usadas son:
 - Mantenimiento de la circulación continua del agua bajo un régimen de flujo turbulento. Esto reduce la propensión a la formación de *biofilms*. Uno de los puntos importantes a verificar en la validación del sistema de agua es, precisamente, que se haya mantenido en el sistema en funcionamiento la velocidad originalmente diseñada. Fluctuaciones en la velocidad de flujo pueden causar problemas de contaminación.
 - El diseño debe considerar reducir al mínimo la extensión de las cañerías.
 - Para sistemas de agua que trabajan a temperatura ambiente, estos deben estar aislados de fuentes de calor.
 - Debe evitarse la construcción de “Patatas muertas” en los sistemas de distribución cuya longitud exceda 1,5 veces el diámetro de la rama lateral.
 - Los manómetros deben ser de tipo “membrana”.
 - Las válvulas deben ser de tipo “a diafragma”.
 - Las cañerías deben instalarse considerando su pendiente y caída hacia los puntos de drenaje.
 - Por otro lado, el crecimiento de microorganismos puede verse inhibido por:
 - Lámparas de irradiación de luz ultravioleta intercaladas en el sistema
 - Manteniendo el sistema calefaccionado (entre 70 y 80 °C)
 - Sanitizando los sistemas de temperatura ambiente sobrecalentado con agua caliente por encima de los 70 °C, agua sobrecalentada o vapor limpio.
 - Medio de desinfecciones químicas con Ozono u otros agentes químicos. En estos casos es esencial demostrar que el agente ha sido removido antes de utilizar el agua para procesos productivos u otras aplicaciones que podrían afectar al producto (lavado, por ejemplo)

Calificación y Validación de Sistemas de Agua

Dada la importancia que tiene el agua en la industria, no podemos dejar de considerar los sistemas de agua, cualquiera sea, como críticos. Precisamente por esta característica se deben calificar y validar los sistemas de generación, almacenamiento y distribución del agua que se utiliza.

Es importante señalar que no es lo mismo validar un sistema nuevo que uno existente.

Calificaciones y Validaciones para Sistemas Nuevos:

Se considera a un sistema como nuevo a aquel que se instala por primera vez en un edificio (nuevo o existente), o aquellos sistemas existentes que sufren alguna modificación. En este último caso los criterios de calificación y validación aplicarán al conjunto de elementos que se modifican respecto del sistema existente. Finalmente, en estos casos, el equipo de validaciones de cada empresa decidirá el alcance de los trabajos a realizar.

En cualquiera de los casos mencionados en el párrafo anterior, las tareas de calificación y validación comienzan en el momento que la empresa decide construir o modificar un sistema de agua. Es, en ese preciso momento, donde deben armarse los grupos de trabajo para llevar a cabo no solamente la documentación de ingeniería sino aquella correspondiente a calificaciones y validaciones.

El primer documento a desarrollar es el denominado **Requerimiento de Usuario** que no deberá incluir solamente las necesidades técnicas, analíticas o productivas, sino que deberá contemplar todos los aspectos del sistema que se vaya a instalar, según se detalla a continuación, con algunos ejemplos:

- *Requerimientos generales* (calidad, volúmenes, utilización)
- *Requerimientos de la instalación* (en un nivel o en varios)
- *Requerimientos de equipos principales* (osmosis reversa, electrodeionización, destiladores, intercambiadores de calor, entre otros)
- *Requerimientos de los sistemas asociados* (controles, alarmas, comunicaciones)
- *Requerimientos de los servicios* (aire acondicionado, vapor, aire comprimido, gases inertes)
- *Requerimientos de instrumentos a instalar* (calibrables, aptos para su aplicación)
- *Requerimientos de limpieza, sanitización y distribución* (metodología, aplicación, frecuencias)
- *Requerimientos de documentación* (planos isométricos, de arquitectura, de instrumentación y cañerías – P&ID, calificaciones de o los proveedor/es)
- *Requerimientos de sistemas informáticos*. (PLC's de control, lógica del sistema, comunicaciones, registro de variables y alarmas. Seguridad de los datos y del manejo)
- *Requerimientos de mantenimiento*. (listado de repuestos críticos, frecuencias y tipos de mantenimiento, capacitación del personal)
- *Requerimientos para los proveedores* (auditorías y calificaciones de los proveedores, antecedentes, calificaciones del personal de los instaladores, capacidad económica)
- *Requerimientos en seguridad y protección ambiental* (manejo de efluentes, manejo de equipos, niveles de iluminación y de ruidos, contención de derrames)
- *Requerimientos relacionados con el personal* (de todos los sectores que participan: capacitaciones, calificaciones, disponibilidad, nivel educacional)
- *Requerimientos regulatorios / normativas de aplicación* (normas a cumplir, nacionales, regionales o internacionales)

Fácilmente, podemos ver que si se desarrolla un **Requerimiento de Usuario** amplio y con la participación de todos los sectores involucrados, el sistema se habrá pensado acabadamente y se habrán minimizando, de esta forma las "sorpresas", mayores costos y problemas de calidad o provisión.

Inmediatamente de concluido el Requerimiento de Usuario y mientras se diseña el sistema de agua se deberá

desarrollar el **Plan Maestro de Validación (PMV)** del Sistema de Agua.

Este documento resume la manera de encarar en forma general la validación del sistema de agua y expresa las ideas y los criterios utilizados para definir un desempeño adecuado. Todas las actividades relacionadas al sistema de agua deben ser incluidas en el PMV.

El PMV debe tener un formato y contenido establecidos por procedimientos pero, a su vez, debe ser breve, conciso y claro. Pero por sobre todas las cosas no debe repetir información ya establecida en otros documentos. Toda vez que corresponda, deberá referirse a otros documentos tales como Políticas, Procedimientos, Informes u otra documentación pre-existente. Es un documento que debe ser preparado y consensuado por todos los sectores intervinientes en el proyecto.

El contenido mínimo de un PMV, para un sistema de agua, se indica a continuación:

1. Descripción general del sistema
2. Alcance del PMV y del sistema a calificar
3. Ubicación
4. Cronograma de tareas (incluyendo prioridades).
5. Responsabilidades del personal interviniente (claramente definidas)
6. Referencias a otros documentos (normas, farmacopeas, procedimientos).
7. Consideraciones específicas del sistema a validar (sistema de agua y complementarios)
8. Lista de elementos (o subsistemas) a ser calificados con indicación del nivel de calificación (ejemplo, DQ; IQ; OQ y/o PQ).
9. Atributos generales a considerar en cada etapa de las calificaciones y sus criterios de aceptación.
10. Formato de la documentación (requerida por procedimientos)
11. Control de Cambio (referencia a este documento) para su aplicación irrestricta.

Luego de redactado el PMV y, en la medida que se van completando las diferentes fases del proyecto (diseño, instalación, puesta en marcha, desempeño) se deben redactar los diferentes tipos de protocolos para calificar cada una de las etapas. Los protocolos, clásicamente establecidos, son:

1. **Calificación de Diseño (DQ):** En esta calificación se verifica que el proyecto a construir e instalar cumple con el Requerimiento de Usuario (RU) para ello se desarrollan protocolos donde se controla punto a punto cada uno de las especificaciones establecidas en el RU. En caso de haber diferencias, se deberán tomar las acciones pertinentes para demostrar que estas no van en detrimento de aquello que fue requerido. Solamente luego de haber aprobado la Calificación de Diseño y de haber resuelto las diferencias (si las hubo) se podrá comenzar con la construcción de los diferentes componentes del sistema y con su instalación.

2. **Calificación de Instalación (IQ):** Luego de completada la instalación y antes de la puesta en marcha de cada uno de los componentes se debe verificar que lo instalado cumple con lo aprobado en la Calificación de Diseño. La Calificación de Instalación debe presentar un alto nivel de detalle, para que ello sea posible se debe requerir la información pertinente a los proveedores para luego controlar contra lo instalado. Sin esta información, es prácticamente imposible desarrollar una Calificación de Instalación moderna que cumpla con altos estándares de calidad. Luego de completar satisfactoriamente la Calificación de Instalación se puede poner en marcha cada uno de los componentes del sistema para verificar su operación.

3. **Calificación de Operación (OQ):** Una vez que se ha resuelto la Calificación de Instalación y que esta ha alcanzado los criterios de aceptación previamente establecidos se puede poner en marcha el sistema (mediante cada uno de los elementos que lo componen). Luego de poner en funcionamiento el sistema se deberá llevar a cabo la Calificación de Operación. En esta fase de la calificación se verificará que todos los elementos funcionan según lo establecido. Se deberán hacer pruebas de alarmas, los sistemas automáticos manejados por PLC's deberán ser desafiados y sus respuestas serán registradas. En esta fase de la calificación se deberá controlar el

adecuado funcionamiento de todos los elementos que hacen al sistema (desde el ingreso del agua de provisión, equipos de pre-tratamiento, equipo de tratamiento y sistemas de almacenamiento y distribución). Al concluir esta calificación, los procedimientos relacionados con la operación, mantenimiento y control del sistema deben haber sido aprobados y puestos efectivamente en uso. Luego de comprobar que todos y cada uno de los elementos que componen el sistema operan adecuadamente y que los procedimientos han sido efectivamente implementados se puede dar por aprobado la Calificación de Operación y se puede seguir al próximo paso de la validación que es la Calificación de Desempeño (PQ).

4. Calificación de Desempeño (PQ). Es la última etapa de la validación del sistema y consiste en tomar muestras de los diferentes puntos y con diversas frecuencias para demostrar que se alcanzan las especificaciones de calidad pretendidas. Clásicamente esta calificación se divide en tres fases y se prolonga por, al menos, un año para evaluar el comportamiento del agua debido a variaciones estacionales. Es importante destacar que no es necesario esperar un año para utilizar el agua en procesos. El agua puede ser utilizada luego de completar satisfactoriamente la fase uno de esta calificación.

Con respecto a las distintas fases de la Calificación de Desempeño se pueden encontrar importantes referencias en los documentos de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los EEUU y de la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO *Technical Report* 929, Anexo 3)

Seguimiento del Sistema.

Luego de completar la fase 3 del programa de calificación de desempeño debe efectuarse una revisión e informe. A partir de este documento debe establecerse una rutina de seguimiento basada en los resultados de la fase 3.

Este seguimiento es una combinación de la información que entregan los instrumentos instalados en línea, (flujo, presión, temperatura, conductividad y carbono orgánico total) con aquella obtenida a partir de las muestras tomadas para evaluar la calidad microbiológica.

Las muestras deben ser tomadas de puntos de uso y/o de muestreo específicamente definidos a partir de los resultados de la calificación de desempeño. Las muestras de los puntos de uso deben ser tomadas de la misma forma en que el agua es utilizada para los diferentes procesos.

Con la frecuencia que se establezca deben realizarse análisis complementarios tales como pH, metales pesados, nitratos entre otras determinaciones.

Este seguimiento debe hacerse aplicando análisis de tendencia.

Calificaciones y Validaciones para Sistemas Existentes

Sistemas existentes son aquellos instalados en las plantas y que no han sido modificados en los últimos años. En este caso y dado que normalmente no se tomaron todas las previsiones más arriba mencionadas se hace muy difícil reunir la información básica necesaria para que la calificación sea lo suficientemente completa y robusta para poder afirmar que el sistema está "validado".

Sin embargo, y considerando las aplicaciones del agua, algo hay que hacer. Seguidamente se indican los documentos mínimos que se deberían reunir (si existen) o preparar (en caso de no tenerlos) para lograr un conocimiento lo más detallado posible del sistema de agua.

Estos son:

- 1) Listado de los puntos de uso con sus identificaciones.
- 2) Planos del sistema en su conjunto (desde el ingreso del agua de suministro - o fuente) con indicación clara de los puntos de uso y/o muestreo. Este plano debe mostrar la instalación real en el edificio
- 3) Planos isométricos que indiquen los materiales utilizados, las pendientes del sistema de distribución, los puntos de drenaje y los equipos instalados en el sistema con el mayor grado de detalle posible.

- 4) Si el sistema tiene algún grado de automatismo es necesario un plano (o esquema) que muestre las vinculaciones entre los puntos de control y los elementos actuadores.
- 5) Procedimientos de manejo, mantenimiento, sanitizaciones y muestreo.
- 6) Calificaciones del personal que atiende, de una manera u otra el sistema.
- 7) Ensayos documentados del funcionamiento de las alarmas del sistema (si las posee)
- 8) Registros de calibraciones de los instrumentos instalados
- 9) Listado de repuestos
- 10) Sistema actualizado de Control de Cambios
- 11) Plan de Muestreo pormenorizado (análisis a realizar, frecuencias, puntos a muestrear) con seguimiento (análisis de tendencia).
- 12) Revisión de todo desvío a lo especificado con investigaciones importantes y detalladas.
- 13) Procedimientos que demuestren fehacientemente que el agua, siempre que es utilizada para producción, ha sido recolectada y analizada previamente.

Mantenimiento y Revisiones del Sistema de Agua

Independientemente que el sistema sea nuevo o existente, este debe ser mantenido de acuerdo a un programa controlado de mantenimiento que considere, al menos, lo que se indica a continuación:

- Frecuencias establecidas para los diferentes componentes
- Programa de calibraciones
- Procedimientos específicos para las tareas.
- Control de repuestos
- Emisión controlada de las tareas de mantenimiento y sus procedimientos.
- Revisión y aprobación del sistema para su uso luego de completarse las tareas.
- Registro y revisión de fallas encontradas durante las tareas de mantenimiento.

Sumado al Mantenimiento del sistema, cada cierto tiempo debe efectuarse una revisión del mismo con representantes de Ingeniería (Mantenimiento), Producción, Control de Calidad y Aseguramiento de Calidad evaluando los puntos que se indican a continuación:

- Cambios efectuados al sistema
- Desempeño del mismo
- Confiabilidad
- Tendencias
- Fallas
- Investigaciones desarrolladas
- Resultados fuera de especificaciones
- Documentación
- Libros de registro
- Listado de procedimientos actualizados.

Bibliografía

1. WHO *Guidelines for drinking-water quality*, 3rd edition. Geneva, World Health Organization, 2003.
2. *Water and steam systems*. International Society for Pharmaceutical Engineering, 2001. ISPE Baseline™ Pharmaceutical Engineering Guide, Volume 4.
3. American Society of Mechanical Engineers. *Bioprocessing Equipment Standard*. ASME — BPE 2000
4. *Guide to inspections of high purity water systems*. Maryland, US Food and Drug Administration (FDA). 1993.
5. US Pharmacopoeia, USP 36.
6. Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme. PIC/S; Inspection of Utilities; P1 009-1. Geneva, Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme, 2002.
7. *Pharmaceutical Water, System Design, Operation and Validation*. William W. Collentro. Interpharm. 1999

Biopelículas

Blanca M. Rosales y Silvia E. Rastelli

- *Formación y desarrollo de biopelículas*
- *Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas*
- *Casos de estudio*
- *Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas*
- *Bibliografía*

Formación y desarrollo de biopelículas.

Una gran variedad de microorganismos están presentes en todos los ambientes acuáticos (o muy hidratados), tanto naturales como industriales. Estos microorganismos constituyen y viven en comunidades multicelulares y presentan gran tendencia a fijarse y crecer sobre superficies bióticas o abióticas inmersas en el agua y formar las denominadas *biopelículas* ⁽¹⁾. En ambientes naturales es frecuente encontrar microorganismos eucariotas como algas, protozoos y hongos junto a las bacterias, mientras que en ensayos de laboratorio o ambientes naturales extremos se encuentran biopelículas constituidas casi exclusivamente por procariotas ⁽²⁾.

La transición de microorganismos que se desplazan en ambientes líquidos como células libres a fijados en superficies como parte de comunidades en biopelículas, procede en diversas etapas, que culminan en la formación de estructuras complejas de células: planctónicas, adheridas, estructuradas en microcolonias o macrocolonias o desprendidas ⁽³⁾.

Si bien existen varios modelos y descripciones, el desarrollo de una biopelícula puede generalizarse en las siguientes etapas ⁽⁴⁾:

- a) **Acondicionamiento:** se produce la instantánea adsorción de productos orgánicos con los cuales los microorganismos no están relacionados (película condicionante).
- b) **Adhesión de especies bacterianas pioneras:** algunas bacterias se adhieren a la superficie sumergida en cuestión de horas.
- c) **Colonización de otros microorganismos:** otras bacterias y hongos comienzan a asociarse a la superficie luego de la colonización de las pioneras en cuestión de días.
- d) **Acumulación:** se produce el agregado de partículas, células muertas y compuestos de metales. Estos pueden encontrarse como productos de corrosión o como iones en solución.

En la Figura 1 puede observarse un esquema de formación de una biopelícula sobre un sustrato según Jenkinson and Lappin-Scott, 2001 ⁽⁵⁾. Su formación comienza con la **adhesión** de bacterias a una superficie previamente acondicionada, es decir, donde ya se ha producido la adsorción de materia orgánica proveniente del medio acuoso. Luego se produce la **colonización** de la superficie debido a la división de las células adheridas y a la liberación de material polimérico extracelular (MPE) (ver detalles mas adelante), posteriormente comienzan a **acumularse** hasta llegar a formar una comunidad en equilibrio o “**comunidad clímax**”, en la que pueden distinguirse microorganismos sésiles (pegados a la superficie e inmóviles) y planctónicos (los que se mueven

con el flujo de agua). La biopelícula madura, ya establecida, no se mantiene estática sino que es una entidad dinámica y una vez alcanzado un tamaño crítico se produce su **dispersión**: una parte de ella puede ser desprendida por el movimiento del líquido y redepositarse en otra zona donde el proceso se reiniciará.

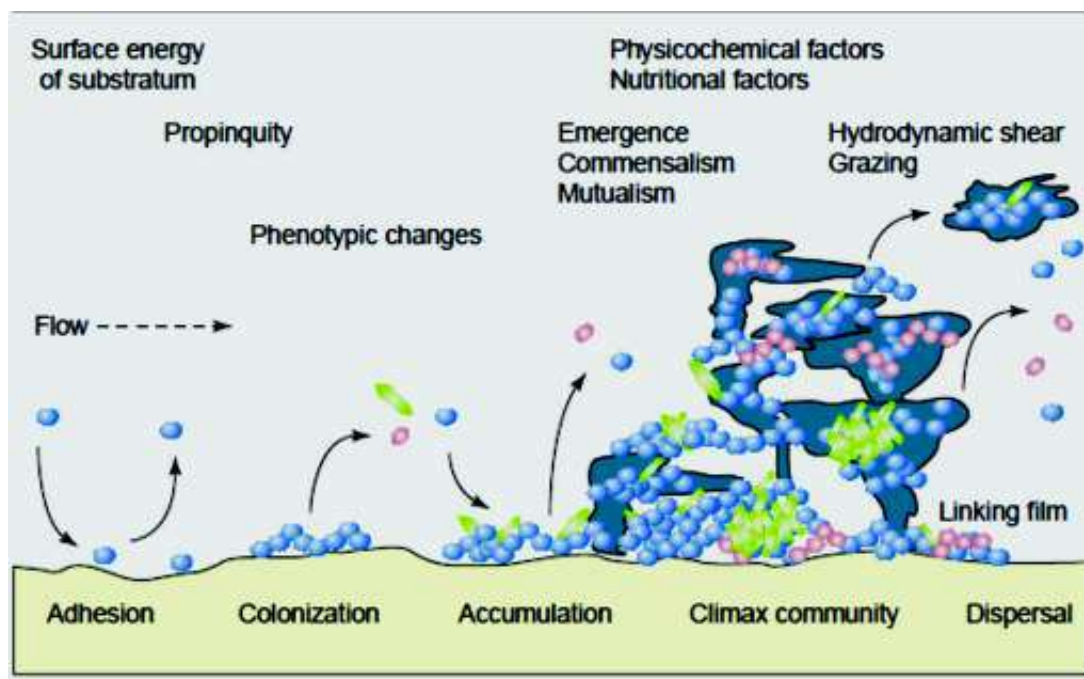


Figura 1. Etapas de desarrollo de una biopelícula. Extraído de Jenkinson and Lappin-Scott, 2001 (5).

En el inicio de la formación de la biopelícula las células se adhieren a un sustrato, y un sustrato al cual no se pueden adherir las células tiene todavía que ser descubierto. La falta de comprensión o al interpretar la información de la superficie de la célula, tal como su hidrofobicidad o carga, ha resultado al menos en lo que a las células bacterianas concierne, en una falta de consenso sobre la importancia de factores físico-químicos en la adherencia no-específica. Una perspectiva sostiene que la distinción entre la adherencia específica (mediada por el receptor) y no-específica es artificial ⁽²⁾. Sin embargo, está claro que en la adherencia no-específica una combinación de todos los rasgos conduce a un conjunto célula-superficie que establece la afinidad por el sustrato. Si la composición de la superficie de la célula o del sustrato cambia, la afinidad puede cambiar. Organismos modelo, tales como cepas con definidas mutaciones en la pared celular o composición conocida de exopolímero, y sustratos modelo cuyas características físico-químicas superficiales fueran conocidas podrían usarse para predecir su tendencia a adherirse no-específicamente.

En el laboratorio, el sistema en estudio se mantiene generalmente limpio para evitar errores que puedan derivarse de contaminantes, especialmente moléculas orgánicas. Sin embargo, en sistemas naturales no existen sustratos limpios: son rápidamente (en minutos) cubiertos con una delgada película de contaminantes orgánicos designados como película condicionante. La composición de esta película puede ser influenciada por las propiedades físico-químicas del sustrato.

Las biopelículas constituyen un modo de crecimiento que permite a los microorganismos sobrevivir, aún en ambientes hostiles, siendo sus fenotipos, fisiología y comportamiento significativamente diferentes de sus contrapartes planctónicas ^(6,7). Las características estructurales, químicas y fisiológicas de una biopelícula dependen tanto de los microorganismos que la constituyen como de las condiciones ambientales locales. Las bacterias en biopelículas no sólo difieren de las planctónicas de su misma especie, sino además en biopelículas mono-específicas demuestran vasta heterogeneidad en términos de metabolismo, expresión de genes y fisiología debido a las diferentes condiciones o microubicaciones. En la última década se han logrado grandes progresos en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de adhesión bacteriana, comprensión de la estructura y

composición de las biopelículas (3,8).

Las biopelículas son dinámicas con respecto a su estructura y composición, pero pocos estudios se han ocupado de las consecuencias del crecimiento de las biopelículas o de las últimas etapas de su desarrollo. Por lo tanto, se sugiere que las biopelículas deberían ser estudiadas desde un punto de vista diferencial espacio/temporal similar al del desarrollo de la biología. Esquemas generalizados del desarrollo de biopelículas deben ser comprendidos y se los debe investigar en condiciones que sean equivalentes a las que experimenta esa particular biopelícula cuando se desarrolla en la naturaleza. Aunque esta revisión provee visiones espaciales y sobre la composición de ciertos momentos en el desarrollo de biopelículas, debe tenerse en cuenta que el desarrollo es un proceso continuo.

Como ya se ha mencionado, un componente muy importante que mantiene la integridad estructural de la biopelícula lo constituye el MPE, también llamado matriz extracelular, generado en su mayor parte por los mismos microorganismos que la componen (5,7,9). Esta matriz tiene un aspecto de gel y está constituida por proteínas, iones Ca^{+2} , cadenas de polisacáridos y agua que permiten la cohesión entre las células y las protegen de las condiciones hostiles del medio.

La masa de material polimérico se comporta como una membrana de intercambio iónico debido a su alto grado de hidratación. La estructura total de la biopelícula puede asimilarse a un sistema dinámico gobernado por diversos mecanismos de transporte que tienen lugar en su espesor.

Este comportamiento social llevado a cabo por las bacterias para formar las biopelículas es debido a una interacción molecular, que funciona como un sistema de comunicación célula-célula, denominado *quorum sensing* (Figura 2). En este sistema, las bacterias se “comunican” su presencia entre sí, liberando y respondiendo a la acumulación de “señales” mediante compuestos químicos autoinductores. Actualmente, se ha introducido el término sociomicrobiología para el estudio de este comportamiento (10,11).

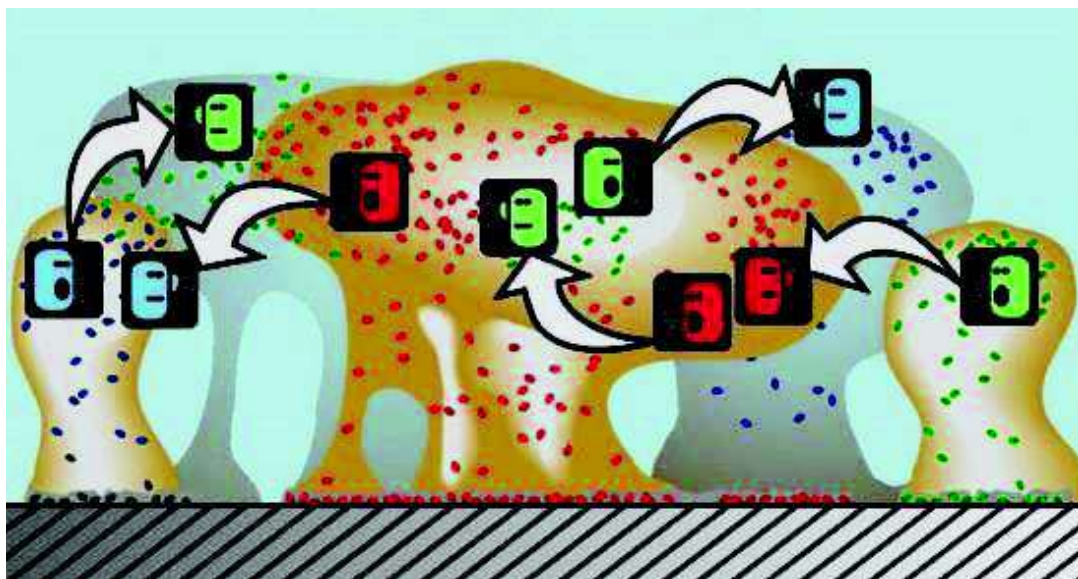


Figura 2. Representación esquemática del sistema de comunicación célula-célula en una biopelícula (13).

Además de la formación de biopelículas existen otros procesos fisiológicos regulados por el *quorum sensing*, entre los que pueden citarse la virulencia, la resistencia a antibióticos y metales pesados y la conjugación (12).

El exponencial incremento experimentado en las investigaciones sobre biopelículas refleja la reciente disponibilidad de nuevas herramientas para encarar estas investigaciones en los últimos años. Un importante concepto en esta tarea es el de ecosistema. Aunque muchas biopelículas son perjudiciales, como la placa dental, las asociadas a implantes quirúrgicos, la resistencia y persistencia de microorganismos patógenos en sistemas de distribución de agua potable y las biopelículas corrosivas en diversas industrias, otras biopelículas son aprovechadas por el ser humano. Plantas de tratamientos de aguas y procesos industriales basados en el uso de lodos activados revelan la

utilidad de las biopelículas. Es la ecología de estas biopelículas la responsable de la efectividad de los procesos y si por algún cambio en las condiciones ambientales la composición de la biopelícula se alterara, disminuiría la efectividad de los procesos y podría aún colapsar ^(2, 14).

La acción de los polímeros presentes en el MPE depositados sobre los sustratos metálicos es la clave para entender los fenómenos de corrosión microbiológica.

Los cambios en el tipo y concentración de iones, en los valores de pH y niveles de oxígeno pueden modificar el estado pasivo del metal o la composición o distribución de los procesos de corrosión induciendo importantes modificaciones en los parámetros usados para evaluar la velocidad de dicho proceso.

Un modelo simplificado de una interfase metal / solución en presencia de bioensuciamiento implica la transferencia de protones y oxígeno a través de la estructura mixta película pasiva / biopelícula. Ambas especies son importantes reactivos en las reacciones catódicas del proceso de corrosión. Si se tiene en cuenta que los microorganismos pueden alterar en gran medida la concentración o la difusión de esas dos especies mediante la respiración (consumo de oxígeno) o la producción de metabolitos ácidos (producción de protones) se puede entender fácilmente la importancia de las biopelículas en los procesos de corrosión (Figura 3).

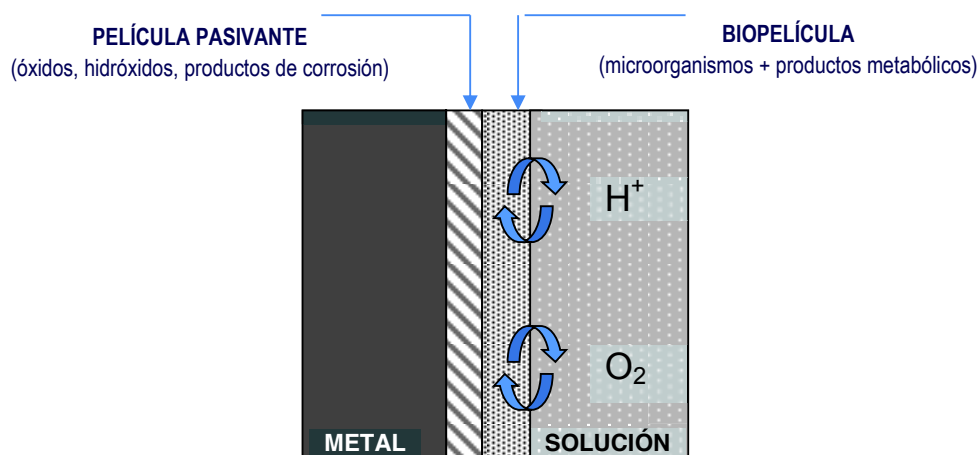


Figura 3. Alteración de la doble capa eléctrica causada por la formación de una biopelícula.

Muchos son los factores que pueden influir en la formación de biopelículas. Entre los más importantes se pueden destacar: fuerzas iónicas, tipo y concentración de cationes presentes en el medio (valencia y carga) y características superficiales del sustrato.

Numerosas reacciones biológicas y físico-químicas tienen lugar en los sistemas de distribución de agua potable, las que generan modificaciones en las características organolépticas y bacteriológicas del agua distribuida. En estos sistemas hay compuestos orgánicos biodegradables designados genéricamente carbono orgánico asimilable (COA) que proporcionan el recurso primario para la formación de una cadena trófica dentro de la tubería ⁽¹⁵⁾. Además, el material de la cañería, los desinfectantes utilizados (principalmente clorados), la velocidad del flujo de agua y otros parámetros que se controlan periódicamente afectan el desarrollo de la biopelícula ⁽¹⁶⁾.

El ataque interior de las cañerías que forman una red de distribución de agua potable es principalmente debido a la corrosión influenciada por microorganismos (CIM). Es típica de sistemas naturales e industriales en los que se desarrollan biopelículas microbianas sobre metales o aleaciones en contacto con el agua. Esta influencia de los microorganismos sobre la corrosión es debida a su capacidad de cambiar variables ambientales como el pH, el poder oxidante, vinculado a su vez a otros compuestos como el O_2 y otros más complejos, controlantes en conjunto de la "capacidad redox" del medio acuático, la velocidad de flujo y la concentración de especies químicas en la superficie del metal. Esto puede resultar en el inicio de un proceso de corrosión, en el cambio del mecanismo de corrosión -de uniforme a localizado- o en un aumento o disminución de la tasa de corrosión. Existen también microorganismos capaces de inhibir la corrosión, Nagiub y Mansfeld, 2001 ⁽¹⁷⁾ observaron la

inhibición de la CIM del AI 2024, de acero de bajo carbono y de cartuchos de latón en agua de mar artificial. Por lo tanto los procesos de formación de biopelículas tienen gran importancia tanto en la CIM como en su inhibición^(1,18,19).

Técnicas aplicadas al estudio de biopelículas.

Los efectos de la interacción entre los más variados materiales estructurales y los microorganismos presentes en aguas ya se reflejaban en la literatura internacional desde la década de 1970 ⁽²⁰⁾. Las investigaciones se dirigían a la constatación de hechos de validez general, como la secuencia de formación de biopelículas, basadas en la adsorción de biopolímeros, seguidas de colonización y crecimiento de células o animales y finalmente mineralización. Aunque la naturaleza de este proceso de bioensuciamiento parece ser universal, el tiempo que toma la ocurrencia de estos eventos varía desde minutos hasta días, dependiendo de los sistemas y de la concentración de la biomasa en el fluido.

La magnitud del bioensuciamiento depende de la conformación macromolecular predominante del biopolímero inicial, si bien se desconoce la naturaleza exacta de la película condicionante. Estudios mediante microcalorimetría y otras técnicas de análisis superficial demostraron en diversos sistemas que los eventos de adsorción resultaban termodinámicamente favorecidos.

Las investigaciones de biopelículas se desarrollan siguiendo dos tipos de procedimientos: *in situ*, mediante técnicas de química superficial, biofísica, bioquímica, inmunología e ingeniería de transferencia de calor, o *ex situ*, sobre biopelículas removidas de la superficie mediante raspado, tratamiento ultrasónico, remoción con solventes, etc. Se considera el primero como el más seguro ya que permite resguardar la integridad y orientación originales de la película sobre el sustrato.

Para tal tipo de estudios se han empleado exitosamente técnicas como la reflexión interna de espectroscopia infrarroja (FTIR), elipsometría, medidas de potencial superficial, determinaciones de ángulo de contacto, microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis elemental dispersivo en energía (EDS) y difracción de rayos X. Aunque cada una de ellas da un muy variado tipo de información en conjunto proveen un fructífero enfoque cuando se las aplica complementariamente.

Posiblemente la más rápida y sensible técnica conocida para identificar cambios en la constitución superficial de cualquier material está basada en la medida de ángulo de contacto. Los métodos ampliamente desarrollados durante varias décadas por Zisman y coautores en el *Naval Research Laboratory*, EEUU, dieron lugar a una vasta literatura sobre propiedades de líquidos y sólidos que constituyen valiosos aportes a las investigaciones sobre biopelículas.

Los espectros infrarrojos de reflexión interna (IR signature) son otro ejemplo que muestra los estadios más incipientes de formación de biopelículas como la primera evidencia de adsorción sobre materiales. La secuencia de espectros durante diversos tiempos de inmersión en agua revela el crecimiento de la biomasa depositada sobre determinado sustrato luego de variados tiempos de inmersión, desde una proteína detectable en la película seca, pasando por un incremento del espesor en la respectiva banda, debido a su acumulación, hasta los cambios asociados a su hidratación o a un subsiguiente estado hidroxilado. Al cabo de un mayor período de seguimiento se detectan adicionalmente bacterias aisladas y posterior engrosamiento del depósito por incremento en el número de células, así como la presencia de flagelos y de nuevas estructuras de anclaje al sustrato.

Entre las más difundidas técnicas de estudio de biopelículas cabe señalar su caracterización mediante diversas microscopías ⁽²¹⁻³⁰⁾. Tales estudios se encararon para investigar las posibles causas de la alarmante velocidad de corrosión de tuberías de metales en instalaciones industriales y municipales de agua. Picaduras formadas en las paredes de cañerías de cobre pueden perforarlas al cabo de unos pocos meses en sitios cubiertos por biopelículas formadas por abundantes poblaciones bacterianas. La dificultad para caracterizar tales procesos resulta del alto grado de hidratación de las biopelículas que recubren las superficies. Las técnicas analíticas en microscopía de fuerza atómica (AFM) desarrolladas para estos estudios permitieron apreciar notables detalles en la visualización de poblaciones bacterianas heterogéneas asociadas a biopelículas sobre metales ⁽³¹⁻³⁶⁾. Comparada con la microscopía ambiental de barrido (ESEM) esta técnica provee una visión más realista y en la escala de los nanómetros, de la superficie celular y del ordenamiento espacial del material extracelular que lo envuelve. La AFM muestra el recorrido de la superficie en los 3 ejes x, y, z, dando el máximo nivel de detalle

topográfico de la configuración celular, del material polimérico y la ubicación espacial de las fallas que provoca en el sustrato metálico.

La microscopía de epifluorescencia confirma que ciertas especies bacterianas son capaces de adherirse y multiplicarse sobre una superficie de cobre. La heterogénea conformación de esas biopelículas sería responsable de formar celdas de aireación diferencial y variaciones en pH, responsables del incremento de la velocidad de corrosión localizada bajo los depósitos.

La predicción del riesgo y la velocidad de desprendimiento de biopelículas debido a los esfuerzos mecánicos de corte durante la circulación del fluido ha sido una prioridad en la comprensión del bioensuciamiento de redes de distribución de agua en cualquier industria. Tales desprendimientos constituyen la base de la propagación del fenómeno a lo largo de la red además de reducir la calidad del producto transportado e incrementar los costos de producción. En agua potable, en especial constituyen una causa de pérdida de calidad y el grave riesgo de distribución de gérmenes patógenos en poblaciones.

Desde el descubrimiento de la omnipresencia de las biopelículas y del amplio rango de sus efectos sobre estructuras industriales se desarrollaron diversos proyectos internacionales para investigar y comprender sus consecuencias negativas en sistemas acuosos ⁽³⁷⁾. Uno de los puntos focales encarados fue la aparente discrepancia entre la simple estructura de una biopelícula y la complejidad de los variados problemas que origina. El concepto inicial de células bacterianas embebidas en matrices homogéneas de sus exopolímeros difícilmente permitía explicar cómo las más profundamente alojadas en la red accedían a los nutrientes del seno de un fluido. Tampoco resultaba comprensible cómo ciertos agentes antibacterianos podían penetrar hasta la superficie colonizada sin matar las bacterias ubicadas más superficialmente en la biopelícula, como se demostró mediante espectroscopia atenuada de reflectancia total-transformada de Fourier (ATR-FTIR).

La comprensión de mecanismos que permitieran explicar tales hechos fue considerada esencial para desarrollar soluciones a los problemas de ingeniería debidos a las biopelículas microbianas, en el Centro de Ingeniería en Biopelículas de la Universidad de Montana, EEUU. La tarea de desarrollar un apropiado concepto y modelo de la estructura de biopelículas fue encarada en prácticamente todos los proyectos y estudios de ese Centro. Como resultado de tales investigaciones llevadas a cabo en los años 90 mediante aplicación de diversas técnicas microscópicas (SEM, ESEM, CSLM) se revelaron estructuras de notable complejidad y heterogeneidad. En combinación con sofisticado instrumental y novedosos procedimientos los avances científicos logrados permitieron dilucidar características de las biopelículas que permitieron evitar y/o minimizar numerosos de los problemas industriales, ambientales y médicos detectados.

Casos de estudio.

La red de distribución de agua potable de la Ciudad de Buenos Aires es similar y contemporánea de su homóloga de la Ciudad de Londres ⁽³⁸⁾. Al cabo de unos 80 años de servicio, ambas presentaron dos tipos de fallas que parecían colocarlas al límite de sus respectivas vidas útiles. Las cañerías de fundición de hierro desnudo de 8 a 12 cm de diámetro habían acumulado tanto depósito interior de color marrón rojizo, que bloqueaba el transporte del fluido y se producían frecuentes perforaciones. Ambas fallas causaban la interrupción del servicio para reemplazar los tramos afectados.

En Londres se procedió a la remoción mecánica del material acumulado y se aplicó en el interior de la red pintura epoxi bajo agua, con un costo aproximado de 350 millones de dólares.

Para Buenos Aires se implementó un control periódico basado en análisis de las películas formadas dentro de tramos retirados de servicio. Se encontraron depósitos interiores de muy variado espesor desde pocos mm hasta varios cm, que se analizaron mediante técnicas complementarias.

A diferencia de lo supuesto, se determinó que el material acumulado no provenía de la corrosión de la cañería, cuya velocidad de corrosión había sido muy baja durante toda la vida útil de la red, y por el contrario los depósitos analizados presentaban apreciable poder protector contra su corrosión interior. Evaluada la evolución del problema con el tiempo se decidió conservar los depósitos.

En base a los resultados de las diferentes técnicas se decidió cada intervención local necesaria, tanto para la protección anticorrosiva de la red como para el control microbiano del agua potable.

En posteriores estudios, se analizó en laboratorio el efecto de las biopelículas que se forman en el interior de redes de distribución de agua potable y cuáles pueden o no ser causantes de CIM ⁽³⁹⁾. La fuente microbiana

utilizada fue la existente en la red de agua potable de la ciudad de La Plata. Los ensayos se diseñaron para caracterizar las etapas iniciales de colonización, adherencia y ataque microbiano sobre 4 materiales utilizados para cañerías (Fe, Zn, Cu y polipropileno (PP). Las especies bacterianas recolectadas de cada sustrato se caracterizaron a través de conteo del número total por unidad de área (UFC.cm⁻²), determinación del fenotipo, tinción de Gram y capacidad de formación de biopelículas (CFB).

La comparación entre materiales reveló variable susceptibilidad a la colonización y a la corrosión por la comunidad microbiana presente en la red. La abundancia relativa de biopelículas concordó con los conteos microbianos totales determinados sobre los distintos sustratos.

El número total de microorganismos sésiles (UFC.cm⁻²) dependió del sustrato. Sobre Zn se determinaron los máximos números totales de UFC, adherencia y diversidad de fenotipos. La menor colonización bacteriana se encontró sobre PP. Este resultado podría deberse a la falta de oligoelementos para las bacterias y a una menor rugosidad superficial en el PP.

La estructura, química y fisiología de una biopelícula depende de los microorganismos que la constituyen, del ambiente en el que se forma y de las características físico-químicas del sustrato. Diferentes mecanismos de formación de biopelículas son de gran importancia, así como sus posibles efectos inhibidores sobre la corrosión del material de una red.

La presencia de contaminantes químicos, antropogénicos y de origen natural como el arsénico (As), es un creciente problema sanitario y social en todo el Planeta ^(40,41).

Sorprendentemente, los 5.000 µg.l⁻¹ de As⁺⁵ adicionados a uno de los circuitos de agua potable en este estudio no sólo permitieron el crecimiento de todos los fenotipos, sino que estimularon el desarrollo de biopelículas más abundantes, gruesas o compactas sobre todos los sustratos. Estos resultados concordarían con el concepto de la formación de biopelículas como un mecanismo de defensa o resistencia de los microorganismos, en este caso en particular, contra el As.

Se midió la absorbancia de bacterias adheridas y de las planctónicas por el método de cristal violeta a 600 nm. Se calculó la capacidad formadora de biopelículas (CFB) = DO adheridas / DO planctónicas. Una *Sphingomonas* sp aislada de las muestras de Cu arrojó el mayor valor de capacidad formación de biopelícula.

Se observaron a simple vista diferencias de distribución en las biopelículas formadas sobre los 7 replicados de cada material expuesto en los circuitos cerrados de agua potable en ausencia y en presencia de As⁺⁵. Sobre cada metal los microorganismos y las biopelículas que forman se mezclan con los productos de corrosión y con material espurio aportado por el agua de río. Sobre Cu y sobre PP se detecta una única y delgada fase de biopelícula que permite observar las bacterias sobre la superficie (mediante SEM, ESEM). Las biopelículas formadas sobre los sustratos metálicos más corroídos, Fe y Zn presentan varias fases, por lo que en la mayoría de los casos los productos de corrosión dificultan la observación de las bacterias.

La aleatoria vista panorámica de los 7 replicados así como la muy heterogénea distribución y cantidad de biopelículas desarrolladas sobre cada sustrato sugirió la necesidad de profundizar el análisis estructural del estudio previo, mediante las más diversas microscopías (SEM, ESEM, CLSM) ⁽⁴²⁾. El objeto de este trabajo fue investigar el efecto de las estructuras interna y externa de las biopelículas sobre la susceptibilidad de colonización y corrosión de los sustratos ensayados, mediante diversas técnicas de microscopía, analíticas y de biología molecular. El desarrollo de técnicas moleculares permitió el estudio de comunidades microbianas. La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) es comúnmente usada para identificar genéticamente la composición, diversidad y dinámica de una comunidad microbiana ⁽⁴³⁾.

Los resultados mostraron correlación entre las morfologías de ataque de los sustratos, la estructura 3-D de las biopelículas y el perfil genético de las comunidades establecidas.

Las diferentes técnicas aplicadas proveyeron visiones complementarias del crecimiento de biopelículas sobre los distintos sustratos.

Mecanismos de prevención / mitigación de la formación de biopelículas.

Si bien lo ideal sería poder prevenir la formación de biopelículas sobre los sustratos, aún no se conoce una técnica que impida o controle satisfactoriamente este proceso, sin causar efectos indeseables.

Una de las principales estrategias es la limpieza y desinfección periódica antes de que los microorganismos puedan fijarse definitivamente a un sustrato. Hay sensores capaces de detectar tempranamente la presencia de una biopelícula y de estimar cuándo desinfectar y cuánto desinfectante adicionar para proteger una superficie.

Es muy importante tener en cuenta el acabado de la superficie, ya que defectos y rugosidades no sólo favorecen la formación de biopelículas sino que dificultan su limpieza y eliminación (2, 44).

El intento de inhibir la formación de biopelículas mediante la limitación de la fuente de C, ha resultado inadecuado, ya que se ha detectado la presencia de biopelículas hasta en sistemas con agua ultra pura.

La primera oportunidad de afectar el desarrollo de una biopelícula es sobre el sustrato. Modificar el sustrato o su capacidad de adherencia no-específica es un atractivo y simple enfoque para impedir la iniciación de una biopelícula en condiciones controladas. Sin embargo, cuando la diversidad de los microorganismos relevantes aumenta, la posibilidad de limitar el crecimiento de la biopelícula disminuye. Como la alteración de la composición de la película condicionante puede afectar la adherencia de microorganismos específicos, modificar el sustrato para inhibir la adsorción de ciertas clases específicas de moléculas es otra forma de controlar la adhesión. Alternativamente, una sustancia puede ser aplicada para aumentar la adherencia de un organismo en particular, reduciendo por lo tanto la eficiencia de adhesión de un microorganismo indeseable (2). Estos simples enfoques no funcionan en situaciones naturales complejas (como en corrosión marina), pero pueden resultar exitosos en condiciones más controladas a las cuales están expuestas catéteres y prótesis médicas.

Intentos por combatir los estadios iniciales de formación de la biopelícula se podrían realizar sabiendo que la adherencia resulta de la interacción entre la química de la célula y la del sustrato, y que la interacción puede ser modificada por una delgada película orgánica (película condicionante). Eventos de reconocimiento célula-célula que influyen la formación de biopelículas con especies mixtas ofrecen una oportunidad de intervenir en la composición de comunidad, y una mayor comprensión de cómo interactúan metabólicamente los microorganismos dentro de la biopelícula resultará en una estrategia de intervención basada en la fisiología de la comunidad.

Otra manera es incorporar productos antimicrobianos a las superficies mediante la aplicación de recubrimientos antimicrobianos o cambiando las propiedades físico-químicas de la superficie. Está demostrado que el agregado de amonio cuaternario, plata, y una amplia variedad de surfactantes modifica la capacidad de adhesión de las células disminuyendo la formación de biopelículas.

También son utilizados, los denominados “químicos verdes” (44), entre los que se encuentran enzimas, fagos, metabolitos. Dada la heterogeneidad del material presente, suele ser necesario adicionar una mezcla de enzimas para lograr la degradación de una biopelícula. Además se ha encontrado un efecto sinérgico cuando se aplican enzimas proteolíticas y glucolíticas junto con ondas ultrasónicas, así como también en combinación con detergentes, surfactantes y antimicrobianos fenólicos. Lamentablemente estas técnicas aún no son tan usadas debido a su elevado costo respecto de otros químicos convencionales. Los fagos son virus que infectan bacterias y proporcionan una natural, altamente específica y no tóxica manera de controlar varios microorganismos involucrados en la formación de biopelículas. La actividad infecciosa de los fagos es altamente influenciada por la composición química de la biopelícula, de factores ambientales como la temperatura, su concentración y fase de crecimiento. Si el fago posee enzimas degradadoras de polisacáridos y/o logra la lisis de una considerable cantidad de células, la integridad de la biopelícula es rápidamente reducida. La tercera de estas “estrategias verdes” es la producción -por parte otras especies bacterianas- de algún metabolito que interfiera en el desarrollo y formación de la biopelícula. Muchas bacterias son capaces de sintetizar y excretar biosurfactantes con propiedades anti-adherentes. Cepas específicas de *E.coli* liberan al ambiente polisacáridos capaces de inducir alteraciones físico-químicas de la superficie previniendo la formación de biopelículas de una amplia variedad de bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas. También se ha demostrado que la producción de sideróforos por algunas bacterias puede ejercer biocontrol al actuar como agentes quelantes de hierro.

Como se mencionó al principio de este capítulo las bacterias usan para comunicarse entre sí un sistema de señales químicas denominado “*quorum sensing*” que les confiere la capacidad de formar biopelículas. Una mejor identificación de estos procesos, así como de los productos que actúan como señales célula-célula, permitiría desarrollar una nueva y más eficiente forma de control de las biopelículas mediante la identificación de productos que pudieran actuar como antagonistas del *quorum sensing* para la formación de biopelículas.

Para llevar adelante un efectivo control de biopelículas es fundamental comprender el tipo y la naturaleza de los residuos contaminantes (hidratos de carbono, grasas, proteínas, sales minerales) y de los microorganismos que

hay que desprender de las superficies. Además, la selección de detergentes y desinfectantes debe hacerse en base a su efectividad, seguridad y facilidad de eliminación, en especial en función de la naturaleza corrosiva de los posteriores tratamientos químicos y los efectos sensoriales en los productos finales ^(45,46). La mejor remoción de residuos en los enjuagues previos contribuye en los posteriores esfuerzos al reducir la cantidad de productos de limpieza usados. El diseño de los equipos y la elección de los materiales superficiales son importantes para prevenir la formación de biopelículas.

El material más conveniente para el equipamiento de procesos es el acero inoxidable, el cual debe tener una adecuada terminación superficial, pulidos, cepillado, "lapping" y pulido electrolítico o mecánico. Un requisito previo para un eficiente programa sanitario es que el diseño de los equipos se haya sido realizado teniendo en mente elevados estándares de higiene. Espacios muertos, esquinas, grietas, juntas, empaquetaduras, válvulas y juntas son puntos especialmente vulnerables a la acumulación de biopelículas ⁽⁴⁷⁾.

La fabricación de productos para consumo doméstico/cosméticos, a diferencia de los sistemas de enfriamiento de agua y de elaboración de papel -que son principalmente procesos continuos con un relativamente elevado nivel de consumo de agua-, se basa en procesos en bateas estancas sin recirculación de agua ⁽⁴⁸⁾. La elaboración de este tipo de productos consiste esencialmente en la mezcla de ingredientes químicos con variables contenidos de agua, almacenamiento y envasado del producto final. El principal problema de estos productos es su potencial contaminación con agua en la que los bactericidas o fungicidas hayan resultado en una deficiente prevención debido al desarrollo de resistencia a los preservantes comúnmente utilizados, adicionados al producto final. Se ha demostrado que microorganismos que forman biopelículas se pueden localizar en diferentes sitios dentro de la planta productora, generalmente dentro de cañerías, en zonas estancas y en tanques de almacenamiento resultando ser los causantes de contaminación microbiana. Las cañerías son consideradas las mayores fuentes de problemas en una planta. No es posible abrirlas para observarlas por dentro, y la cantidad de contaminantes de las cañerías es generalmente significativa. Una vez contaminada, es la parte más difícil de limpiar y de mantener libre de infección.

No hay prácticamente referencias en la literatura técnica disponible sobre biopelículas en los procesos de manufactura. El mayor énfasis en el control de biopelículas en esta aplicación es evitar la contaminación mediante el mantenimiento de la limpieza y la higiene en la planta. Se recomienda el continuo monitoreo del estado de la higiene de la planta, incluyendo la inspección visual y el muestreo periódico para efectuar conteos bacterianos. Los niveles específicos aceptables de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml varía entre empresas y entre plantas, pero 10^3 UFC/ml es considerado un número generalmente correspondiente a una relativa limpieza de la planta.

El agua purificada es la más empleada materia prima en la industria farmacéutica. El deterioro de la calidad microbiológica del agua puede afectar la calidad y seguridad de los productos ⁽⁴⁴⁾. Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales o pueden adherirse a las superficies, donde crecen en comunidades altamente organizadas de biopelículas multicelulares. Las biopelículas son la forma predominante de vida microbiana en la naturaleza, así como en enfermedades crónicas persistentes. Las infecciones por biopelículas en prótesis o en implantes son difíciles de erradicar porque encuentran muy superior protección contra macrófagos y antibióticos, comparada con células aisladas, conduciendo a severas complicaciones clínicas generalmente con riesgos de vida.

En sistemas acuosos las biopelículas actúan como reservorios de microorganismos- incluidos los patógenos que pudieran estar presentes en el agua- que al liberarse esporádicamente, causan gran incremento de la densidad celular. Los factores biológicos, químicos y físicos que provocan el desprendimiento son complejos y no completamente comprendidos. Son probablemente múltiples los factores asociados a los procesos de adhesión y desprendimiento, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, esfuerzos de corte, control ambiental de la biosíntesis de exopolisacáridos, y procesos erosivos en los cuales células individuales se pierden del cluster de biopelículas, etc ⁽⁴⁹⁾.

Recientemente se han reportado cambios en la estructura de biopelículas durante su crecimiento que afectan fuertemente el proceso de desprendimiento, siendo responsables del deterioro de la calidad del agua.

Se sabe que las células en las biopelículas desarrollan creciente resistencia a agentes antimicrobianos y a factores ambientales, causando contaminación microbiana del agua en instalaciones industriales. La mayoría de los estudios consideran desinfección de agua potable pero pocos se ocupan del agua purificada a temperatura ambiente. Biopelículas presentes en sistemas de almacenamiento y distribución de agua purificada son difíciles

de detectar, inactivar y eliminar.

Estudios realizados por Florjanic y Krist (2006) ⁽⁵⁰⁾ reportan el impacto de dos regímenes para la desinfección de un sistema de agua purificada con ozono en función de la concentración y el tiempo 70 ± 20 ppb en el reservorio en uno de los regímenes de producción y 250 ± 20 ppb en el sistema total, durante desinfecciones semanales. Se medían los conteos heterotróficos en placa (HPCs) y la concentración total de compuestos orgánicos (TOC). Sobre un período de cuatro años, 94-98% de las muestras de agua exhibían HPC entre 0-5 UFC/ ml, y ninguna ≥ 50 UFC/ml. A pesar del aumento del TOC al ingreso del agua hasta 40 ppb, el conteo microbiano del agua purificada en el circuito de distribución resultó inafectado. Se destacó que los aspectos críticos frente a la contaminación microbiana del sistema de agua purificada fueron las válvulas y tuberías usadas para transferir agua a los equipos. Los niveles especificados de ozono previenen el crecimiento de microbios y la formación de biopelículas en el sistema de distribución hasta una medida en que pueden poner en riesgo la calidad del agua y aún esporádicamente liberar microbios al agua.

La actual comprensión de la fisiología y microecología son resultado de estudios *in vitro* en los que se usan modelos de biopelículas. Tales modelos se pueden utilizar para replicar condiciones de laboratorio o enfocar el efecto de diversas variables, como el impacto de la hidrodinámica, concentración de nutrientes y antimicrobianos en el crecimiento de biopelículas.

Consecuentemente, el enfoque para diseñar un sistema y sus características operacionales debe ser desarrollado para cada caso en particular. Un relativamente nuevo método de laboratorio para investigar biopelículas en agua potable es el reactor anular de biopelículas, (BAR). No hay aún estudios publicados sobre bioestabilidad de agua purificada empleando este dispositivo.

La biología de biopelículas es un joven campo que requiere de muy básicas y extremadamente cruzadas disciplinas y a veces investigaciones esotéricas. Sin embargo, esa investigación sentará las bases de la verdadera comprensión de complejos problemas tales como la corrosión influenciada por microorganismos y enfermedades orales y contribuirá grandemente a nuestra comprensión de los más significativos estilos de vida en la tierra.

Bibliografía

1. Dexter S.C. ASM Handbook. *Corrosion: Fundamentals, Testing and Protection*, Vol.13, A, p. 398-416, 2003.
2. Palmer R.J. Jr. and White D.C. *Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control*. Trends in Microbiology, Vol. 5, (11), p. 435-440, 1997.
3. Monds, R.D., O'Toole, G.A. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. Trends in Microbiology Vol. 17, p. 73-87, 2009.
4. *Metals handbook* vol. 13, p. 492, 1987.
5. Jenkinson, H.F and Lappin-Scott, H.M. *Biofilms adhere to stay*. Trends in Microbiology, Vol. 9, (1), p. 9-10, 2001.
6. Branda S.S., Vik A., Friedman L. and Kolter R. *Biofilms: the matrix revisited*. Trends in Microbiology Vol.13 (1), p. 20-26, 2005.
7. Shirtliff M.E, Mader J.T. and Camper A.K. *Molecular Interactions in Biofilms*. Chemistry & Biology, Vol. 9, p. 859-871, 2002.
8. Karen, O. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. Res. Microbiol. Vol. 159, p. 415-422, 2008.
9. Beech I.B., Sunner J.A. and Hiraoka K. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. International Microbiology, Vol.8, p.157-168, 2005.
10. Parsek M.R. and Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in Microbiology, Vol.13, (1), p.27-33, 2005.

11. Blackwell H. E. Bacterial Crowd. *Control with Iron*. Chemistry & Biology, Vol. 12, (7), p. 721-723, 2005.
12. Atlas R.M y Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología Ambiental*. Capítulo 3, p. 59-92. Pearson Educación S.A. Madrid, España, 2002.
13. <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbok/v004/r003/contents/chapters/chapter002/section006/blue/pa ge001.html>. Permiso de la imagen para la página web: P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman.
14. Berry D., Xi Ch. and Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Environmental biotechnology*, Vol 17, p. 297–302, 2006.
15. Dukan S., Levi Y., Piriou P., Guyon F. and Villon P. Dynamic modelling of bacterial growth in drinking water networks. *Water Research*, Vol. 30, (9), p. 1991-2002, 1996.
16. Lehtola M.J., Laxander M., Miettinen I.T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P.J. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes. *Water Research*, Vol. 40, p. 2151-2160, 2006.
17. Nagiub A. and Mansfeld F. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition using electrochemical noise analysis. *Corrosion Science*, Vol.43, p. 2001-2009, 2001.
18. Rosales B.M., Cabezas A.C., Chichizola S.E and Fernández A. MIC corrosion of babbitt alloys. 3rd. Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium, Florianópolis, Brazil, 1998.
19. Rosales B.M. Electrochemical, metallurgical and biochemical aspects of the microbially influenced corrosion. 5th. LABS Campeche, México, 2004.
20. Goupil, D.W., De Palma, V.A. and Baier, R.E., Physical/Chemical characteristics of the macromolecular conditioning film in biological fouling, V International Congress of Marine Corrosion and Fouling, Marine Biology, p.401-410, Barcelona, 1980.
21. A microscopic view of corrosion. Center for Interfacial Microbial Process Engineering News, Montana State University, Bozeman, p. 1-6, Spring, 1992.
22. Gamby J., Pailleret A., Boucher C.C., Pradier C.M., Tribollet B. In situ detection and characterization of potable water biofilms on materials by microscopic, spectroscopic and electrochemistry methods. *Electrochimica Acta*, 54, p.66–73, 2008.
23. Beech, I.B. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms - an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* PII 0964-8305, p.141-149, 1996.
24. Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K. and Holden, P.A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 68 (3) p.577–587, 2007.
25. Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R. and Scheetz, R. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal Ind Microbiol* 8 (4) p. 213–221, 1991.
26. Walker, J.T., Verran, J., Boyd, R.D., and Percival, S. Microscopy methods to investigate structure of potable water biofilms. *Methods Enzymology*. 337, p. 243–255, 2001.
27. Stewart P.S., Murga R., Srinivasani R. and de Beer D. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research* 29, (8), p. 2006-2009, 1995.
28. Wagner, M., Ivlevab N.P., Haischb C., Niessnerb R. and Horna H. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Research* 43 (1) p. 63–76, 2009.
29. Lewandowski Z. Notes on biofilm porosity. *Water Research* 34 (9) p. 2620-2624, 2000.
30. Pitts, B. and Stewart, P. Confocal laser microscopy on biofilm: Successes and limitations. *Microscopy today*, p. 18-22, 2008.
31. Bremmer. P. J. Geesey, G. G. and Drake, B. Atomic force microscopy examination of the topography of a

- hydrated bacterial biofilm on a copper surface. *Current in Microbiology*, 24, p. 223-230, 1992.
32. Steele A., Goddard D.T. and Beech I.B. An atomic force microscopy study of the biodeterioration of stainless steel in the presence of bacterial biofilms. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 34 (1), p. 35-46, 1994.
 33. Saa A., Teschke O. Extracellular polymeric bacterial coverages as minimal area surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 304, p. 554–557, 2006.
 34. van der Aa B.C., Dufrene Y.F. In situ characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 23, p.173–182, 2002.
 35. Núñez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Spain E.M. Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42, p. 263–271, 2005.
 36. Núñez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Duong L.K., Sindhurakar A.R. and Spain E.M. Atomic Force Microscopy of Bacterial Communities. *Methods in Enzimology*. Vol.397, p. 256-268, 2005.
 37. Biofilm heterogeneity. Finding the link between structure and function. Center for Biofilm Engineering News, Montana State University, Bozeman, Vol.2, N° 1, Sept. 1994.
 38. Rosales, B.M. *Environmental change and rational water use*, Ed. O.E. Scarpati and J.A.A. Jones, Orientación Gráfica Editora, Buenos Aires, ISBN 978-987-9260-46-3, 2007.
 39. Rastelli S.E., Rosales B.M, Elsner C.I and Pujol E.M. Microbial biofilm interactions with drinking water network materials. 7th. Latinamerican Biodegradation and Biodeterioration Symposium (LABS), Quito, Ecuador, Plenary Lecture. 2009.
 40. Masud Karim M.D. Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Water Research*. Vol. 34, No. 1, p. 304-310, 2000.
 41. Katsoyiannis Ioannis A. and Zouboulis Anastasios I. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. *Water Research* Vol. 38 p. 17–26, 2004.
 42. Rastelli, S.E., Viera, M. and Rosales,B.M. Microscopy Applied to Biofilms in Drinking Water Closed Loop. 18th. International Corrosion Congress, Perth, Australia, Paper 198, 2011.
 43. Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* Vol. 2 (3) p.317-322, 1999.
 44. Simões M., Simões L.C. and Vieira M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* Vol. 43, p. 573–583, 2010.
 45. Mosteller, T. M., & Bishop, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, p.34–41, 1993.
 46. Wirtanen, G., Saarela, M., & Mattila-Sandholm, T. Biofilms – impact on hygiene in food industries. In J. D. Bryers (Ed.), *Biofilms II: Process analysis and applications*, p. 327–372, 2000.
 47. Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 39, p.11–19, 2006.
 48. Ludensky M. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 51, p. 255 – 263, 2003.
 49. Florjanić M., Kristl J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 405, p. 16–22, 2011.
 50. Florjanić, M., Krist, J. Microbiological quality assurance of purified water by ozonization of storage and distribution system. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* Vol. 32, p. 1113–1121, 2006.

Simulación del proceso de llenado aséptico o Media fill

Néstor Oscar Aversa

- *Introducción*
- *Objetivo*
- *Aseguramiento de la esterilidad*
- *Ensayo de Media fill*
 - *Guía de fabricación*
 - *Condiciones del proceso*
 - *Frecuencia y cantidad de ensayos*
 - *Tamaño de lote de cada ensayo*
 - *Medios de cultivo*
 - *Condiciones de incubación*
 - *Inspección de las unidades*
 - *Interpretación de los resultados*
 - *Informe final*
- *Conclusiones*
- *Bibliografía*
- *Abreviaturas*

Introducción:

El concepto de esterilidad de productos farmacéuticos desde ya hace muchos años ha sido considerado como: “Ausencia total de microorganismos vivos”.

Existen dos grandes grupos de productos estériles:

- a) Aquellos que luego de llenados y cerrados reciben un tratamiento esterilizante: *Esterilización terminal*.
- b) Aquellos que por distintos motivos sólo pueden esterilizarse por filtración o bien se elabora por un mezclado entre componentes estériles: *Procesamiento aséptico*.

Para aquellos productos con esterilización terminal existe un razonable acuerdo internacional en cuales deben ser las condiciones del proceso de esterilización, que conduzcan con un razonable margen de seguridad a un producto estéril. A consecuencia de ello es factible realizar una validación del proceso de fabricación, llenado, cierre y esterilización que conduzca a resultados predecibles, reproducibles y **registrables lote a lote**.

En particular, para aquellos procesos con esterilización terminal por calor húmedo (autoclave) se ha desarrollado el concepto de liberación paramétrica ^(1, 2). A través de la misma, existe la posibilidad de liberar el producto sin

necesidad de realizar el ensayo de esterilidad.

No se hallan en el mismo escenario aquellos productos procesados asépticamente. En este caso, la forma de demostrar la esterilidad de cada lote producido ha sido y sigue siendo motivo de controversia y de revisión permanente. Se trata de un proceso **altamente dependiente del comportamiento humano**, de difícil documentación lote a lote, salvo evidencias indirectas y si su proceso de validación ha sido satisfactorio **sólo indica que lo fue ese día**. Por ello, hay que tener en cuenta que la validación del *media fill* (que constituye la calificación de *performance* del procesamiento aséptico) puede ser prospectiva y/o concurrente pero nunca retrospectiva.

Los diseños de dichos procesos deben considerar que la intervención humana sea cada vez menor. Ya hay experiencias concretas y documentos para justificar el uso de aisladores (*isolators* en inglés) como un mecanismo para minimizar la posibilidad de contaminación debido a la intervención humana. ^(3, 4, 5,6)

Objetivo:

El objetivo de este capítulo es revisar la evolución de los conceptos teóricos y prácticos tendientes a asegurar la esterilidad de productos procesados asépticamente. Se detallará en particular el proceso de simulación de llenado con medio de cultivo también conocido por su término en inglés: *media fill*. Previamente, y dada su importancia en la interpretación de los resultados del *media fill*, se desarrollará el concepto de aseguramiento de la esterilidad del punto de vista práctico (estadístico).

Aseguramiento de la esterilidad:

Más allá de la definición teórica de esterilidad, en la práctica ha sido manejada en términos probabilísticos tanto para procesos de esterilización terminal como de procesamiento aséptico. Analíticamente es imposible demostrar la esterilidad en forma absoluta por limitaciones de método, tamaño de muestra, medios de cultivo, condiciones de incubación, variedad de microorganismos.

A los procesos por esterilización con vapor húmedo (autoclave) se le exige una fracción de contaminación de no más de 1 (una) unidad contaminada en 1.000.000 (un millón) de unidades esterilizadas. $P_1 = 1 \times 10^{-6}$ donde P_1 es la tasa máxima de contaminación permitida. En inglés esta tasa se la conoce como **S.A.L.** (*Sterility Assurance Level*).

Para procesos asépticos históricamente se ha considerado un SAL mínimo: $P_1 = 1 \times 10^{-3}$ aunque como se verá más adelante las referencias más actualizadas al respecto han abandonado este criterio.

La importancia de estos conceptos, además de propender a la posibilidad de validar los procesos de esterilización, está potenciada por dos razones fundamentales:

- 1) La criticidad de la mayoría de los pacientes que requieren de productos estériles para mitigar o mejorar sus problemas de salud.
- 2) **La enorme limitación estadística del ensayo de esterilidad**, porque se trata de un ensayo destructivo, es decir que **nunca puede ser repetido sobre la misma muestra** y la cantidad de unidades empleadas para el ensayo es prácticamente constante e independiente del tamaño del lote, **o sea que no existe muestreo estadístico**. En síntesis, constituye un ensayo insuficiente para **asegurar con un margen razonable de confianza estadística que un producto que se dice estéril realmente lo sea**. La aprobación del producto por lo tanto no puede estar basada solo en dicho ensayo. No permite además evaluar la influencia de la introducción de cambios en el proceso.

La probabilidad de detectar la contaminación en un ensayo de esterilidad corresponde al modelo de probabilidad redundante (7), basado en que si 1 (una) sola de las unidades de la muestra de tamaño n está contaminada, es suficiente para que el ensayo de esterilidad falle, o sea que resulte positivo, acorde a la siguiente fórmula:

$$P = 1 - (1 - \text{SAL})^n$$

donde:

P = Probabilidad de detectar una unidad contaminada (nivel de confianza alcanzado).

SAL = Fracción contaminada del lote. Su valor oscila entre 0 (estéril) y $0 < \text{SAL} \leq 1$ (contaminado).

n = Cantidad de unidades tomadas para el ensayo.

En la Tabla 1 se aprecia la limitación mencionada.

Tabla 1: Relación entre el SAL, el tamaño de la muestra y la probabilidad de detectar una unidad contaminada.

SAL	n	P
0.001	20	1.98%
0.001	40	3.92%
0.001	3000	95.03%
0.14	20	95.10%
0.000001	20	0.002%
0.000001	3000000	95.02%

Si el producto estuviese contaminado a una tasa del 0.1% (criterio obsoleto de aprobación del *media fill*) con las 20 unidades empleadas para el ensayo de esterilidad sólo habría una probabilidad cercana al 2% de detectar la contaminación. Aún con el doble de muestras (criterio obsoleto de repetición del ensayo de esterilidad) la probabilidad sería aún bajísima, alrededor del 4%. Sólo analizando 3000 unidades (criterio de cantidad obsoleto de unidades mínimas a ser llenadas para el *media fill*) y con la misma tasa de contaminación, la probabilidad de detectar la contaminación alcanza valores estadísticamente aceptables (95,03%). El lote debería estar al menos contaminado un 14% para ser detectado por el ensayo habitual de esterilidad con el mismo nivel de confianza estadística (95.10%).

Por otra parte, para productos con esterilización terminal por calor húmedo (SAL=0.000001) la probabilidad de detectar una unidad contaminada sería de 0.002% con el ensayo de esterilidad habitual de 20 unidades y la cantidad de unidades que habría que analizar para detectar al menos una unidad contaminada con el mismo nivel de confianza estadístico (95.02%) es ridícula desde todo punto de vista y además supera el tamaño de lote de cualquier producción farmacéutica (tres millones de unidades en un lote).

No obstante ello, sigue siendo el ensayo oficial de las farmacopeas para demostrar la esterilidad a través de un ensayo de laboratorio, aunque indicando que no puede ser el único factor de evaluación ⁽⁸⁾.

Ensayo de Media Fill:

Son varios los factores a tener en cuenta para su correcta realización e interpretación:

Guía de fabricación:

Debe prepararse un documento que describa todos los pasos desde la preparación del medio de cultivo hasta la interpretación final de los datos y sus conclusiones. Este documento debe tener la misma cadena de firmas que una guía de fabricación de productos.

Todos los reactores, recipientes de transferencia, filtros y otros accesorios **deben ser exactamente los mismos que los empleados en la producción rutinaria del producto y lavados y esterilizados según los procedimientos estándar normalizados empleados en los procesos productivos habituales.**

Es mandatorio que el medio de cultivo colocado en el primer reactor sea estéril si el proceso no conlleva ningún

tipo de filtración (caso suspensiones, por ejemplo), o bien estéril o con bajo *bioburden* (carga microbiana) para procesos con filtración esterilizante. Actualmente se dispone de medios comerciales en polvo ya esterilizados por radiación gamma que pueden ser útiles no sólo para la validación de procesos asépticos de productos líquidos sino también de polvos. Para procesos de filtración, la muestra para determinar el *bioburden* debe tomarse antes del último paso de filtración a menos que el segundo filtro sea redundante donde en ese caso se debe tomar la muestra antes de la primera filtración. ⁽¹¹⁾.

En dicho documento deben figurar además:

- *Tamaño de lote*: Indicar la cantidad de unidades que se llenarán, el volumen de llenado y prever un pequeño exceso para compensar el volumen muerto.
- *Medios de cultivo*: Elegir en base a la historia del producto si se empleará un medio de cultivo general para aerobios o si por el contrario debe usarse un medio para anaerobios. Incluir el test de promoción de crecimiento.
- *Tiempos y temperaturas de incubación*: Será una única temperatura, dos temperaturas, cuánto tiempo.
- *Monitoreo ambiental*: Método elegido, mapeo de los cuartos, tiempo de exposición, condiciones de incubación.
- *Conciliación de unidades y rendimiento*. Tener en cuenta las unidades separadas por merma de producción, positivas y unidades estériles.
- *Evaluación de resultados*: Cual será el criterio de aprobación.
- *No conformidades*: Acciones correctivas según corresponda. Qué hacer con los productos ya liberados, los que están en cuarentena. Evaluar la posibilidad de interrumpir la fabricación hasta que una vez tomadas acciones, la validación del *media fill* sea satisfactoria.

Condiciones del proceso:

Previamente a la validación del proceso debe realizarse un análisis de riesgo que contemple las peores condiciones en las que el proceso puede llevarse a cabo. Estas “peores condiciones” tienen que tener la posibilidad de su existencia real en el proceso y no ser solo elucubraciones teóricas.

Condiciones mínimas a tener en cuenta son:

- *Tiempo máximo (holding time)*: Es el tiempo en que el producto puede estar sin ser llenado en su envase final. El medio de cultivo debe prepararse y esterilizarse por filtración manteniéndolo en el recipiente de almacenamiento por el tiempo máximo permitido en la tarea normal de producción.
- *Volumen de llenado*: O bien debe llenarse al valor nominal o algo menor que permita la existencia de una cámara de aire (concentración de oxígeno) que facilite la recuperación y crecimiento de microorganismos aerobios y que además permita el contacto con toda la superficie.
- *Tamaño de lote a ser llenado*: El tiempo de llenado puede ser aumentado en líneas de alta velocidad para tener una visión más representativa del proceso y de sus variables. En ese caso el tamaño de lote será mayor.
- *Velocidad de llenado*: Deben validarse las condiciones extremas de la llenadora (máxima y mínima velocidad). La condición de mínima velocidad permite además evaluar la posible fatiga del operador.
- *Filtración*: Si el producto normalmente es filtrado y llenado bajo atmósfera de Nitrógeno o Anhídrido carbónico, estos gases deben ser reemplazados por aire comprimido para permitir el desarrollo de microorganismos aerobios a menos que la historia del producto indique la posibilidad de existencia de anaerobios (ver medios de cultivo).
- *Paradas de máquina*: Las interrupciones lógicas-apelando a la historia del proceso- que ocurren como ser rotura de material de empaque primario, trabas en la bajada de la tolva de tapones, reemplazo de agujas llenadoras, reemplazo de filtros, carga de tolva.
- *Personal*: Cantidad máxima de operadores posible dentro del sector. Turnos de trabajo diferentes. Los

ensayos deberían realizarse en días y horarios diferentes durante la semana y no solamente al comienzo de la jornada laboral.

- *Equipamiento:* Trenes diferentes de fabricación y llenado para el mismo producto. Áreas diferentes.
- *Muestras:* Retiro de muestras para controles en proceso (volumen, integridad del cierre, otras propiedades).
- *Envase primario:* Geometría del envase primario: los más grandes con la boca más ancha y que estén más expuestos al ambiente, o bien los más pequeños a la mayor velocidad dado que pueden ser inestables y causar derrames e interrupciones de línea. Sistemas de cierre.

Todas estas condiciones deben estar indicadas en la guía de fabricación, cuántas unidades se llenarán como parte del total para cada caso y mantener la secuencia de llenado con los diferentes cambios mencionados a los efectos de poder reconstruir las variables del proceso en caso de aparición de unidades contaminadas. Se recomienda fuertemente el uso de envases primarios con alguna leyenda impresa que indique que se trata de unidades para un ensayo. Bajo ningún aspecto deben emplearse envases primarios con la impresión original del producto.

De ser posible, la filmación del ensayo puede ser muy útil, del punto de vista de documentación así como para capacitar al personal.

Frecuencia y cantidad de ensayos:

Desde los primeros documentos sobre el tema y como parte del concepto histórico de validación generalmente aceptado se recomienda al menos que 3 corridas consecutivas, independientes y satisfactorias sean realizadas durante la calificación de performance de una nueva línea y/o producto y/o tamaño de envase primario ⁽¹⁰⁾. Si los resultados son satisfactorios, el proceso debe revalidarse cada 6 meses como mínimo mediante 1 ensayo. Es importante incorporar estos ensayos como parte de la planificación de la producción para que su realización sea respetada en tiempo y forma.

La aparición de nuevos procesos y/o equipos y/o turnos de trabajo debe ser considerado como si fuera un producto nuevo. La introducción de nuevo personal o bien de más personal que la condición validada también debe ser motivo de evaluación.

En síntesis, cualquier cambio que se solicite para un proceso validado - y el procesamiento aséptico no constituye una excepción - debe ser evaluado para concluir sobre la necesidad o no de revalidar el proceso con otras nuevas 3 corridas satisfactorias.

Para revalidaciones la EMEA recomienda repetir el ensayo dos veces al año, por turno y por proceso y luego de cambios significativos del sistema HVAC, equipos, procesos, cantidad de turnos.

Por otra parte la FDA, indica repetir el ensayo dos veces al año por cada línea incluyendo actividades e intervenciones representativas por cada turno. En un año, todo el personal involucrado en manufactura, incluyendo técnicos y mecánicos debe haber pasado al menos por un *media fill*.

Tamaño de lote de cada ensayo:

Hasta la aparición del documento de la FDA (9) en el año 2004, la cantidad de medio de cultivo necesaria para realizar el *media fill* era de no menos de 3000 unidades ⁽¹⁰⁾.

La situación ideal es que el ensayo tenga el mismo tamaño que el lote productivo, **en particular si el proceso tiene una intervención manual en el llenado o tapado.**

Para líneas automáticas que proceden de manera uniforme o bien realizada dentro de un *isolator* se recomienda entre 5.000 y 10.000 unidades. Dentro de esas unidades deben estar incluidos los desafíos mencionados en "Condiciones del proceso". Si el tamaño de lote es menor a 5000 unidades debería llenarse una cantidad no menor al tamaño de lote.

Durante el llenado aquellas unidades que hubieran sido producto de la merma habitual de producción por

defectos en el cierre, rotas, etc. no deben formar parte de la incubación y deben ser descartadas.

Debe realizarse una reconciliación de unidades de la misma manera que un lote productivo para evitar - independientemente de la identificación primaria de dichas unidades - se pueda generar un *mix-up* con un producto de línea.

Medios de cultivo:

Partiendo del hecho que no existe un medio de cultivo ni condiciones de incubación tales que todos los microorganismos puedan desarrollarse, en los *media fill* se emplean medios de cultivo generales, que no sean selectivos, aunque privilegiando la detección de microorganismos aerobios (bacterias y hongos) salvo que la historia del producto indique la posibilidad cierta de existencia de anaerobios, en cuyo caso se empleará un medio de cultivo acorde.

Los criterios de selección del medio de cultivo deben incluir:

- Baja selectividad.
- Claridad del medio.
- Concentración.
- Filterabilidad.
- Capacidad de soportar el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos.

El medio de cultivo aceptado generalmente es el Caldo Tripteína Soya.

En caso de requerirse un medio de cultivo anaeróbico puede emplearse el Caldo Tioglicolato.

Es necesario realizar el test de promoción de crecimiento acorde a criterios internacionales (*United States Pharmacopeia indicator organisms*) y con cepas aisladas de la propia planta, al menos en los envases llenos del ensayo de simulación y debe obtenerse crecimiento (positivo) dentro de los 5 días subsiguientes a la inoculación.

El inóculo debe ser menor a 100 unidades formadoras de colonia (UFC)/ ml. Es recomendable también realizarlo en el medio de cultivo preparado antes del llenado.

Se indica en la bibliografía ⁽¹²⁾ cómo debe realizarse el ensayo acorde al producto y envase primario:

- Productos líquidos: Si los envases son opacos (colirios por ejemplo) las unidades deben vaciarse luego de la incubación para verificar la presencia/ausencia de crecimiento en el medio de cultivo.
- Productos en polvo: Existen dos posibilidades:
 - Llenar con medio de cultivo líquido los envases primarios.
 - Agregar polvo inerte o medio de cultivo sólido estéril y luego un líquido estéril (medio de cultivo o agua para inyectables respectivamente) o viceversa, debiendo ser hechos ambos procesos on-line. Si se usan sólidos los más comunes son polietilenglicol 8000 y carboximetilcelulosa esterilizados previamente por irradiación. Esta opción es la que debe tomarse como referencia pues - si bien agrega operaciones adicionales - es la que mejor refleja la condición productiva real. Conviene llenar algunas unidades solo con líquido para que actúen como control negativo dado que esta operación doble no es similar al llenado habitual de polvos en el proceso productivo.
- Productos en suspensión: Es similar a otros líquidos con el agregado que la agitación o recirculación debe formar parte de la simulación. Si al granel habitual se le agregan sustancias, éstas deberían estar simuladas con el agregado de líquidos/polvos inertes estériles.
- Liofilización: Debería prevenirse la cristalización del medio de cultivo dado que pueden reducir la probabilidad de recuperación de microorganismos. El método más recomendado es emplear un medio de cultivo líquido y remover el agua hasta un valor determinado de concentración pero no se lo liofiliza y evitando el uso de gases inertes para romper el vacío de la cámara. Debe tenerse en cuenta la concentración inicial del medio de cultivo, que debe estar diluido respecto a su concentración habitual para que luego de la evaporación su concentración sea óptima.
- Productos semisólidos (ungüentos): El medio de cultivo líquido es llevado a la viscosidad del producto

empleando agar o carboximetilcelulosa estéril. Luego de la incubación los envases son vaciados sobre placas de Petri, mezclados y observados para turbidez o presencia de hongos en condiciones óptimas de iluminación.

- Ingredientes farmacéuticos activos (*Active Product Ingredient*) a granel: Puede ser necesario validar por etapas y no siempre es posible simular con medio de cultivo. Debe analizarse cada proceso en particular.

Condiciones y tiempo de incubación:

Existe un acuerdo generalizado en que la incubación no debe ser inferior a 14 días. Es preferible incubar a dos temperaturas diferentes empezando por la más baja: 20-25 °C siguiendo por la de 30-35 °C y no menos de 7 días cada una. Desde punto de vista práctico no suele haber inconvenientes en disponer de recintos voluminosos para la incubación a 20-25 °C (temperatura logable con un aire acondicionado convencional) pero no siempre es accesible un espacio para incubar a 30-35 °C. Puede elegirse una sola temperatura incubando los 14 días en el mismo valor seteado siempre y cuando la variación esté en ± 2.5 °C. Es fundamental también para la elección de la temperatura, la historia de los productos: cuando dieron contaminados, con qué medio de cultivo y a qué temperatura de incubación se expresó la contaminación. La razón de incubar primero a baja temperatura es la posibilidad de recuperar microorganismos injuriados o de lento crecimiento.

Otro factor importante para la selección de las temperaturas de incubación es que aproximadamente el 2/3 de los contaminantes hallados históricamente son de origen humano y su temperatura óptima de crecimiento está en 30-35°C mientras que 1/3 de contaminantes encontrados son de origen ambiental y su temperatura óptima está en 20-25°C.

Antes de iniciar la incubación los envases debieran ser invertidos o manipulados para mojar todas las superficies. Se recomienda realizarlo también durante el periodo de incubación.

Inspección de las unidades:

El 100% de las unidades deben ser revisadas por personal de microbiología o bien por personal convenientemente entrenado.

Si del revisado surgen unidades contaminadas asociadas a un defecto de integridad de la unidad en esta etapa, este punto debe ser cuidadosamente revisado pues bajo circunstancias normales de producción esas unidades podrían llegar al mercado y ser administradas a un paciente.

Los microorganismos hallados debieran ser identificados preferiblemente hasta nivel de especie.

La lectura de las unidades debe ser hecha por comparación con un medio patrón estéril.

Interpretación de los resultados:

En 2004 la FDA emitió un documento ⁽⁵⁾ que reemplazó el criterio originalmente establecido de 0.1% de unidades contaminadas con el 95% de confianza estadística ⁽¹⁰⁾ donde indica que el objetivo debe ser **cero unidades contaminadas en función de la tecnología actualmente disponible**. Diversas organizaciones ya se han manifestado con el mismo criterio ^(13,14,15,16) y deberían aplicarse entonces los siguientes criterios armonizados:

- Cuando se llenan menos de 5000 unidades, ninguna unidad contaminada debe detectarse. La presencia de una unidad contaminada es motivo de revalidación e investigación.

- Cuando se llenan entre 5.000 y 10.000 unidades, una unidad contaminada debería iniciar una investigación, incluyendo la de repetir *el media fill*. Dos unidades contaminadas son consideradas causa de revalidación, con la investigación consiguiente.

- Cuando se llenan más de 10.000 unidades, una unidad contaminada debería resultar en una investigación. Dos unidades contaminadas son consideradas causa de revalidación, con la investigación consiguiente.

Es preciso también reconocer que será difícil lograr ese objetivo en líneas manuales y con elevada intervención

humana.

Si los datos no son satisfactorios, debe evaluarse el impacto sobre los productos manufacturados desde la última validación satisfactoria y reevaluar su liberación. Por ello es fundamental en este estudio registrar cualquier anomalía y ver si se correlaciona con las unidades que aparecen contaminadas.

No se han tenido en cuenta en este capítulo otras interpretaciones del ensayo de *media fill* entre el periodo 1987-2004 para no generar confusión entre los lectores. No obstante ello, están indicadas en la bibliografía ^(17,18).

La revalidación debe ser una tarea normal en los estudios de simulación. En ella debe revisarse y compararse con la validación original lo siguiente:

- Monitoreo ambiental, procesos de desinfección, limpieza de equipos y esterilización (incluyendo recipientes y cierres). **Es importante destacar que la actividad de monitoreo en sí misma no implica necesariamente comprometer la calidad del producto.** Para las áreas que rodean al área de llenado deben elegirse los sectores de mayor movimiento de personal. Para el llenado, lo más cerca posible del mismo y siempre donde haya mayor actividad del personal.
- Mantenimiento rutinario y recalificación de equipos (autoclaves, hornos, sistema de aire-calefacción, ventilación, aire acondicionado), sistemas de agua.
- Testeo rutinario de integridad de filtros, recipientes, cierres y filtros de venteo.
- Entrenamiento del personal. El personal constituye una de las principales fuentes de contaminación microbiológica. Debe existir un programa de entrenamiento formal no solo para los operarios del área sino también para control de calidad, ingeniería. El entrenamiento debe incluir conocimientos de microbiología, GMP, desinfección, conexiones asépticas, procedimientos de vestimenta, límites de alerta y acción, métodos de muestreo. El personal que evalúa el test de simulación debe tener revisiones visuales periódicas.
- Revalidación luego de cambios.

En caso de no conformidad con los ensayos originales o bien con la revalidación es necesario iniciar una investigación profunda. ⁽¹⁸⁾

Los puntos más salientes de la investigación deberían incluir:

- Identificación de la contaminación, de ser posible hasta nivel de especie.
- Revisión de los datos de monitoreo ambiental y del personal del último año.
- Revisión de la documentación generada en el *media fill* para detectar posibles anomalías.
- Revisión de los procesos de esterilización y su estado de calificación.
- Revisión de los procesos de descontaminación.
- Revisión de los datos del sistema HVAC, particularmente los vinculados al mantenimiento de la presión diferencial e integridad de filtros.
- Revisión del estado de calificación de equipos y calibración de instrumentos (agua para inyectables, agua purificada, aire comprimido, etc.) empleados en el proceso.
- Revisión de los procedimientos de limpieza y desinfección y como han sido ejecutados.
- Revisión del entrenamiento y calificación de todo el personal, aún el involucrado en la limpieza.
- Revisión de cualquier cambio que pudiera haber ocurrido desde el último *media fill* satisfactorio.
- En qué instancias aparece la contaminación: creciente durante el llenado (conexiones asépticas deficientes), decreciente durante el llenado (contaminación producida en el *set up* y que luego es “lavada” durante el llenado, contaminación puntual (intervención humana incorrecta) o bien contaminaciones aisladas pero múltiples (indicación de un proceso fuera de control).

La cantidad de corridas a repetir en el caso de no conformidades puede variar entre una (si la causa raíz fue descubierta y se tomaron acciones correctivas) hasta tres (en caso de no detectarse la causa raíz y probar con diferentes modificaciones).

Informe final:

Debe contener la siguiente información ⁽¹⁸⁾:

- Nombres del personal que participaron en los respectivos ensayos de simulación.
- Cantidad de unidades llenadas.
- Cantidad de unidades incubadas.
- Tiempo de incubación y temperatura.
- Cantidad de unidades positivas e identificación de las cajas o bandejas de cada unidad positiva.
- Cantidad de unidades rechazadas a causa de la inspección pre-incubación (recipientes dañados, cierres defectuosos).
- Test de promoción de crecimiento de los medios de cultivo luego de la incubación.
- Conciliación de unidades.
- Identificación de filtros y resultados de los test de integridad de las membranas.
- Resultados de monitoreo ambiental y del personal.
- Registro de eventos ocurridos durante la simulación.
- Registro de desvíos al protocolo.

Este informe final con sus respectivas conclusiones en base a los criterios de aceptación, investigación de la causa-raíz en caso de unidades contaminadas y posibles acciones correctivas y preventivas en caso de ser necesario, debe estar aprobado, firmado y fechado por Aseguramiento de Calidad.

Conclusiones:

- 1) La validación de procesos asépticos aún constituye un desafío para la industria farmacéutica dado que los resultados obtenidos únicamente reflejan que solo han sido satisfactorios en los momentos en que dicha validación fue realizada.
- 2) El proceso de *media fill* debe estar documentado acorde a las Buenas Prácticas de Fabricación de productos farmacéuticos.
- 3) Ha habido una evolución permanente en los criterios de aceptación del *media fill* con el correr del tiempo. Desde el 0.1% directo de unidades contaminadas, el 0.1% con 95% de confianza estadística hasta la ausencia de unidades contaminadas actual también refleja el avance tecnológico producido que permite lograr el objetivo final y que siempre fue el mismo de **cerro contaminación**. Ese avance tecnológico se funda principalmente en la cada vez menor intervención humana a través del uso de aisladores y tecnología de soplado/llenado/sellado.
- 4) Un paso fundamental en la interpretación de los resultados ha sido dado con la armonización de criterios entre FDA, EMEA y PIC/S.
- 5) No existe el *media fill* ideal teniendo en cuenta la cantidad de variables que entran en juego en el proceso real de producción y por lo tanto en el de simulación con medio de cultivo. Por ello es fundamental emplear herramientas de análisis de riesgo para definir el proceso desde su diseño y validarlo acorde al mismo.

Bibliografía:

1. Disposición ANMAT 2819, *Liberación Paramétrica*, Anexo III. 2004.
2. PIC/S *Recommendation on Guidance on Parametric Release*, PI 005-3, September 2007.
3. Disposición ANMAT 2819. *Tecnología del aislador*, Capítulo 18, punto 24. 2004.
4. PIC/S *Recommendation: Isolators used for aseptic processing and sterility testing*. PI 014-3, September 2007.
5. FDA, Guidance for Industry. *Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice, Aseptic Processing Isolators*. Appendix 1, 2004.
6. WHO, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, 44 Report, *Isolator Technology*, page 227, 2010.
7. Joseph M. Juran y Frank M. Gryna, *Redundancy*, Quality Control Handbook, 4th Edition, 23.90-23.91, 1988.
8. USP, <1211> *Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles*, 33rd Edition. 2010.
9. FDA, *Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice*, 4. Size of runs, page 23, 2004.
10. FDA, *Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing*, 1987.
11. PIC/S *Recommendation: GMP Annex 1 Revision 2008, Interpretation of most important changes for the manufacture of Sterile Medicinal Products*, PI 032-2, January 2010.
12. PIC/S *Recommendation on the Validation of Aseptic Processes* 2008, PI 007-5, July 2009.
13. PIC/S *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products*, Annex 1, page 11, September 2009.
14. European Commission, *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Manufacture of Sterile Medicinal Products* (corrected version), page 11, March 2009.
15. WHO, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, 44 Report, *Isolator Technology*, page 220, 2010.
16. Health Products and Food Branch Inspectorate. Canada. *Good Manufacturing Practices (GMP) Guidelines*, GUI-001, pages 78-79, November 2009.
17. The Parenteral Society. *The use of process simulation tests in the evaluation of processes for the manufacture of sterile products*, Technical Monograph N°. 4, June 1993.
18. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. *Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products*, Technical Report N°. 22, 2011.

Abreviaturas:

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

FDA: *Food and Drug Administration*.

EMA: *European Medicines Agency*.

HVAC: Heating, Ventilating, and Air Conditioning

PDA: Parenteral Drug Association.

PIC/S: Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme

USP: United States Pharmacopeia.

WHO: World Health Organization.

EU: European Union.

Sección IV. Métodos de Control.

	página
Capítulo IV.1. Ensayo de Esterilidad Antonia Petracca y Alejandra Vázquez	249
Capítulo IV.2. Endotoxinas bacterianas Beatriz Giampaolo y Nélida Mondelo	276
Capítulo IV.3. Control microbiológico de Medicamentos no obligatoriamente estériles María Cristina Fernández	305
Capítulo IV.4. Verificación de la Aptitud de métodos microbiológicos Sergio Iglesias	325
Capítulo IV.5. Valoraciones de Antibióticos por métodos microbiológicos Mirta Franco	343
Capítulo IV.6. Valoración microbiológica de Vitaminas Graciela Torno	364
Capítulo IV.7. Control microbiológico de Cosméticos Esteban Zarankin	372
Capítulo IV.8. Control microbiológico de Aguas Sergio Iglesias y Mónica Lagomarsino	379
Capítulo IV.9. El complejo <i>Burkholderia cepacia</i> José Degrossi	388
Capítulo IV.10. Monitoreo ambiental Alejandra Vázquez y Claudio Denoya	401
Capítulo IV.11. Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos Luis Jiménez	428

Ensayo de esterilidad

Antonia Petracca y Alejandra Vázquez

- *Consideraciones generales*
- *Muestreo*
- *Métodos*
- *Medios de cultivo*
- *Prueba de Validación para Bacteriostasis y Fungistasis*
- *Área de Siembra*
- *Personal*
- *Procedimiento*
- *Observación e interpretación de los resultados*
- *Tecnologías para el ensayo de esterilidad. Desde las tradicionales avanzando a las automatizadas.*
- *Microbiología rápida*
- *Ensayo de esterilidad: Tecnología de Aisladores*
- *Liberaciones paramétricas*

Consideraciones Generales

El ensayo de esterilidad tiene por objeto revelar las contaminaciones por microorganismos que pueden estar presentes en los productos medicinales, biomédicos, sustancias y todo aquel material que según las farmacopeas tienen como requisito ser estériles, ya sea que hayan sido esterilizados o que hayan sido preparados asépticamente.

El ensayo aparece por primera vez en la Farmacopea Británica del año 1932. En la Farmacopea de Estados Unidos (USP) XI se publicó en el año 1936 para soluciones estériles, utilizando un medio líquido de peptona de carne, e incubando el medio durante 7 días a 37° C. La USP XII describía el ensayo para sólidos y líquidos estériles, se mencionaba la inactivación de algunos conservadores y se investigaba la presencia de microorganismos aerobios y anaerobios. La USP XIII introdujo el uso del caldo de tioglicolato para detectar microorganismos aerobios, anaerobios y microaerófilos con un tiempo y temperatura de incubación de 7 días a 37° C, y el caldo glucosado para detectar hongos y levaduras, incubándose durante 15 días a 22 - 25° C. Además se describía el área en la cual se desarrollaba el ensayo. En la USP XIV, se cambió la temperatura de incubación del tioglicolato, la que pasó de 37° C a 32 - 35° C, debido al crecimiento de bacterias saprófitas no patógenas que podían estar presentes como contaminantes de los productos farmacéuticos. El caldo glucosado se cambió por el caldo de Sabouraud, pero como en realidad no era conveniente que se utilizara un medio de cultivo selectivo para un control, luego se lo reemplazó por un caldo de 2 peptonas, que es el actual digerido pancreático de caseína y digerido papaico de soja.

Estas consideraciones demuestran que se han sucedido cambios constantes que llevaron a perfeccionar las

técnicas de detección de la contaminación, así como también se ensayaron y estudiaron distintos medios de cultivo, ya sea por parte de laboratorios de control estatal como privados.

El ensayo tiene limitaciones que derivan de 2 problemas insolubles:

- 1) La muestra adecuada; y
- 2) La imposibilidad de los medios de cultivo de permitir el crecimiento de todos los microorganismos viables que puedan estar presentes en la muestra.

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

Muestreo

La OMS se basó en los principios estadísticos para realizar un muestreo adecuado, que sea representativo del lote a analizar y por el cual se pueda detectar una posible contaminación.

La probabilidad de **aceptar** por el resultado de un ensayo, lotes que tengan un determinado porcentaje de contaminación está directamente relacionado al tamaño de la muestra más que al tamaño del lote.

Existe además el riesgo de **rechazar** lotes del producto por contaminaciones accidentales durante el ensayo.

Tomando una cantidad razonable de muestras para realizar el ensayo de esterilidad, se detecta solamente una contaminación grosera. Por ello se llega a una conclusión: *En la manufactura de un producto se deben tomar todas las precauciones necesarias para asegurar que el mismo sea estéril.*

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

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

Métodos

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

Para este ensayo es preciso emplear una técnica que sea simple, eficiente, reproducible, que permita analizar un gran número de muestras, que permita el crecimiento de la mayoría de los microorganismos y que sea de bajo costo.

El número de unidades que se deben someter al ensayo y la cantidad de muestra de cada unidad que se debe ensayar, se corresponden con las Tablas N° 1 y 2¹.

Tabla 1- Número mínimo de unidades a ensayar en relación al tamaño del lote

TAMAÑO DEL LOTE (Nº de unidades del lote) *	TAMAÑO DE LA MUESTRA (Nº mínimo de unidades para el ensayo)**
Productos Inyectables < de 100 unidades >de 100 y ≤ de 500 >de 500 solución parenteral de gran volumen	10 % ó 4 (el que sea mayor) 10 2 % ó 20 (el que sea menor) 2 % ó 10 (el que sea menor)
Antibióticos Sólidos Envases de < 5 gr Envases ≥ 5 gr Graneles y mezclas	20 6 <i>Ver granel de productos sólidos</i>
Productos oftálmicos y no inyectables ≤ 200 > 200 Si la presentación es en envases unidos aplicar el esquema para "Productos Inyectables" (2)	5 % ó 2 (el que sea mayor) 10
Dispositivos Médicos ≤ 100 > 100 y ≤ 500 > 500	10 % ó 4 (el que sea mayor) 10 2 % ó 20 (el que sea menor)
Granel de Productos Sólidos ≤ 4 envases > 4 y ≤ 50 > 50	Todos 20 % ó 4 (el que sea mayor) 2 % ó 10 (el que sea mayor)

Tabla 2- Cantidad de muestra a ensayar

CONTENIDO DE CADA ENVASE	CANTIDAD MÍNIMA TOMADA DE CADA ENVASE PARA CADA MEDIO DE CULTIVO
Líquidos < de 1 mL >1 y ≤ a 40 mL < a 40 mL y < a 100 mL >a 100 mL Antibióticos líquidos	Todo el contenido de cada envase Mitad del contenido, de cada envase pero no < a 1 mL 20 mL 10% del contenido del envase pero no < a 20 mL 1 mL
Sólidos < de 50 mg > de 50 mg a < de 300 mg ≥ 300 mg a 5 gr > a 5 gr	Todo el contenido del envase Mitad del contenido, de cada envase pero no < a 50 mg 150 mg 500 mg
Antibióticos a granel	500 mg
Materiales quirúrgicos, algodón, gasa	100 mg/ paquete
Suturas y otros materiales descartables	Envase completo
Otros dispositivos médicos	Dispositivo completo, cortado en piezas o desarmado

Tabla N° 3- Cantidades para artículos líquidos en relación al volumen de los medios de cultivo

Contenido del envase (ml)	Volumen mínimo tomado de cada envase para cada medio	Volumen mínimo de cada medio	
		Usado para transferencia directa del volumen tomado de cada envase (ml)	Usado para membrana o media membrana representando el total del volumen de un número apropiado de envases (ml)
Menos de 10	1 ml, o el contenido total si es menor de 1 ml	15	100
10 a menos de 50	5 ml	40	100
50 a menos de 100	10 ml	80	100
50 a menos de 100, para administración intravenosa	Contenido completo	-	100
100 a 500	Contenido completo	-	100
Más de 500	500 ml	-	100

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo empleados en este ensayo son dos caldos, el Medio fluido de tioglicolato y el Caldo de peptonas de soja y caseína. Se debe controlar la fertilidad del medio, la posibilidad de detectar una contaminación baja y la esterilidad del mismo.

Los medios de cultivo pueden prepararse de acuerdo a las fórmulas que se dan a continuación o empleando mezclas deshidratadas comerciales de fórmulas similares que, después de reconstituidas siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante, cumplan con la Prueba de promoción del crecimiento. También pueden adquirirse medios preparados listos para usar.

Medio Fluido de Tioglicolato

L-Cistina	0,5 g
Agar	0,75 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) / ($C_6H_{12}O_6$)	5,5 g/ 5,0 g
Extracto de levadura (soluble en agua)	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
o Acido tioglicólico	0,3 ml
Solución de resazurina sódica (0,1 %), recién preparada	1,0 ml
Agua purificada c.s.p	1 000 ml

pH después de la esterilización: $7,1 \pm 0,2$.

Mezclar y calentar hasta disolución completa. Ajustar el pH del medio con hidróxido de sodio 1 N de modo que, después de la esterilización, tenga un pH de $7,1 \pm 0,2$. Si fuera necesario, filtrar en caliente a través de un papel de filtro humedecido. Distribuir el medio en recipientes de vidrio que ofrezcan una relación entre la superficie expuesta y la profundidad de medio, tal que no más de la mitad superior experimente un cambio de color al final del período de incubación, indicativo de la fijación de oxígeno. Esterilizar usando un proceso validado. Si más del tercio superior ha tomado una coloración rosada, el medio podrá recuperarse por una sola vez, calentándolo en un baño de agua o con vapor fluente, hasta que desaparezca el color. Cuando el medio está listo para usar, no más del décimo superior debe tener un color rosado.

Usar el Medio Tioglicolato para incubación en condiciones aeróbicas a una temperatura de 30 - 35 °C. Para productos que contengan sustancias mercuriales puede usarse este medio de cultivo en el Método directo, como reemplazo del Caldo de peptonas de soja y caseína, incubándolo a 20 - 25 °C. Incubar ambos medios durante 14 días, observándose a intervalos regulares.

Caldo Tioglicolato Alternativo

L-Cistina	0,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O) / (C ₆ H ₁₂ O ₆)	5,5 g/5,0 g
Extracto de levadura (soluble en agua)	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
o Acido tioglicólico	0,3 ml
Agua purificada c.s.p	1000 ml

pH después de la esterilización: 7,1 ± 0,2.

Disolver los componentes sólidos en el agua, calentando suavemente si es necesario hasta obtener una solución. Ajustar la solución con hidróxido de sodio 1 N de manera que, después de la esterilización, tenga un pH de 7,1 ± 0,2. Filtrar si fuera necesario, colocar en recipientes adecuados y esterilizar por autoclave. El medio debe ser recientemente preparado o calentado en un baño de vapor y enfriado rápidamente antes de su uso. No se debe recalentar. Usar el Caldo Tioglicolato Alternativo para incubación en condiciones anaeróbicas a una temperatura de 30 - 35 °C

Caldo Digerido de Caseína - Soja

Digerido pancreático de caseína	17,0 g
Digerido papaínico de harina de soja	3,0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O) / (C ₆ H ₁₂ O ₆)	2,5 g/2,3 g
Fosfato dibásico de potasio.	2,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua purificada c.s.p	1 000 ml

pH después de la esterilización: 7,3 ± 0,2.

Disolver los componentes sólidos en el agua, calentando suavemente. Enfriar la solución a temperatura ambiente y ajustar con hidróxido de sodio 1 N, si fuera necesario, para obtener un pH de 7,3 ± 0,2 después de la esterilización. Filtrar si fuera necesario y envasar en recipientes adecuados. Esterilizar por un proceso validado. Usar el Caldo Digerido de Caseína - Soja para incubación en condiciones aeróbicas a una temperatura de 20 - 25 °C.

Medios para penicilinas y cefalosporinas

Quando el Medio Fluido de Tioglicolato y el Caldo de Peptonas de Soja y Caseína se emplean en el Procedimiento de transferencia directa para penicilinas o cefalosporinas, transferir en forma aséptica a cada tubo de medio, una cantidad de penicilinasa suficiente para inactivar la cantidad de antibiótico presente en la muestra. Determinar la cantidad apropiada de penicilinasa a usar para este propósito utilizando una preparación de penicilinasa, cuya actividad haya sido determinada previamente o confirmar que la cantidad de penicilinasa transferida es la apropiada efectuando el Ensayo de validación para bacteriostasis y fungistasis, usando menos de 100 unidades formadoras de colonias (ufc) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y observando desarrollo microbiano típico. [NOTA: en los medios utilizados para la prueba de esterilidad por filtración por membrana, también puede ser necesario el agregado de penicilinasas].

Esterilidad de los medios de cultivo

Confirmar la esterilidad de cada lote de medio de cultivo, a través de la incubación de al menos una porción del lote a la temperatura especificada y durante no menos de 14 días, o incubando un recipiente con medio no inoculado como control negativo durante la realización de cada prueba de esterilidad.

Prueba de promoción del crecimiento

Examinar cada carga esterilizada de cada lote de medio de cultivo para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano, a través de la inoculación por duplicado, en envases separados de cada medio, de menos de 100 microorganismos viables de cada una de las cepas descritas en la Tabla 3, e incubando en las condiciones especificadas.

Los medios de cultivo son aceptables si existen evidencias de crecimiento en todos los envases inoculados dentro de los 3 días de incubación para bacterias y 5 días de incubación para hongos. Las pruebas pueden ser llevadas a cabo simultáneamente con las pruebas de esterilidad. La prueba de esterilidad no se considera válida si el medio de cultivo muestra una respuesta inadecuada al crecimiento microbiano.

Las cepas de microorganismos deben mantenerse con procedimientos y medios adecuados y se deben utilizar con no más de 5 pasajes de la cepa patrón.

Almacenamiento

Si los medios recientemente preparados no van a usarse en el término de 2 días, se deben almacenar a una temperatura entre 2 °C y 25 °C.

Los medios preparados, que han sido almacenados en envases no perfectamente sellados, pueden ser usados por el término de un mes, siempre que se comprueben su esterilidad y su capacidad de promover el crecimiento dentro del periodo en que se van a utilizar, y si se cumplen los requisitos correspondientes al color del indicador. Si se almacenan en envases adecuadamente sellados, los medios pueden ser usados por un plazo que no sobrepase el año, pero se deben llevar a cabo las pruebas de promoción del crecimiento cada tres meses y además confirmar si se cumplen los requisitos correspondientes al color del indicador.

Soluciones de Lavado y Dilución

Solución A - Disolver 1 g de digerido péptico de tejido animal en agua hasta obtener 1 litro, filtrar o centrifugar para obtener una solución transparente. Ajustar a pH $7,1 \pm 0,2$, envasar en recipientes adecuados y esterilizar empleando un procedimiento validado. [NOTA: cuando la Solución A deba ser usada para realizar la prueba de esterilidad de una muestra de antibióticos del tipo penicilina o cefalosporina, agregar asépticamente una cantidad de penicilinas estéril a la Solución A, a ser usada para lavar la membrana o membranas, suficiente para inactivar el antibiótico residual en las membranas después que la solución de la muestra haya sido filtrada].

Solución D - Si la muestra contiene lecitina o aceite, o en las pruebas para determinar la esterilidad de las partes internas de dispositivos estériles, por filtración a través de membrana, usar la Solución A, a la cual se le ha agregado 1 ml de polisorbato 80 por cada litro. Ajustar a pH $7,1 \pm 0,2$. Transferir a los envases y esterilizar empleando un proceso validado.

Solución K

Digerido péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Polisorbato 80	10,0 g
Agua purificada c.s.p.	1000 ml

pH después de la esterilización: $6,9 \pm 0,2$.

Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar utilizando un proceso validado.

NOTA: la solución de lavado y la dilución utilizada, no deberán presentar propiedades antibacterianas o antifúngicas. Esto se comprueba efectuando la Prueba de validación para bacteriostasis y fungistasis.

Ensayos de Aptitud del Método

Antes de efectuar un ensayo de esterilidad de un producto o material, se determinará el nivel de actividad bacteriostática y fungistática del producto a través de los procedimientos que se explican a continuación. Estos procedimientos se efectúan al menos cada vez que se cambia alguna condición de la prueba o la composición del producto.

Para efectuar los ensayos, preparar cultivos diluidos de bacterias y hongos de al menos los microorganismos indicados en la Tabla 4 de manera de obtener una concentración final de cada uno de los microorganismos usados de menos de 100 ufc por ml.

Ensayo de aptitud del método de filtración por membrana

Filtrar la cantidad de muestra que se usará para realizar la prueba de esterilidad. Si es necesario lavar la membrana con tres porciones de 100 mL de la Solución de lavado y dilución adecuada, inoculando el envase del lavado final con menos de 100 ufc. Repetir el lavado en otro filtro en el que no hubo pasaje de muestra (control positivo). Colocar la membrana o la mitad de la membrana en 100 mL del medio de cultivo especificado, o agregar el medio al embudo o canister que contiene la membrana. Repetir el procedimiento para los microorganismos y los medios especificados en la Tabla 3, e incubar los envases a la temperatura apropiada y bajo las condiciones señaladas por un período no mayor de 5 días.

Si el crecimiento de los organismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en los frascos del control positivo, se usará la misma cantidad de producto y de medio de cultivo cuando se realice la prueba de esterilidad.

Si el desarrollo microbiano del medio de cultivo con producto no es visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir el ensayo aumentando el número de lavados, o cambiando el tipo de membrana, o usando un agente neutralizante.

Ensayo de aptitud del método de transferencia directa

Inocular dos recipientes de cada medio de cultivo con menos de 100 ufc de los microorganismos especificados en la Tabla 4, usando los volúmenes de cada medio especificados en la Tabla 3. Agregar la cantidad de muestra especificada a uno de los recipientes. El restante será el control positivo. Repetir el procedimiento para cada cepa e incubar durante no más de 5 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en los frascos de control positivo, se usa la misma cantidad de producto y de medio de cultivo cuando se efectúa la prueba de esterilidad.

Si el desarrollo microbiano del medio de cultivo con producto no es visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir la prueba utilizando agentes neutralizantes estériles, como polisorbato 80, lecitina o penicilinasa, o incrementar el volumen de medio. Si la cantidad de producto especificada fuese bacteriostática o fungistática en 250 mL de medio de cultivo, reducir la cantidad del producto hasta encontrar la cantidad máxima que no afecta adversamente el crecimiento de microorganismos en 250 mL de medio. En el caso de soluciones y suspensiones, si la cantidad fuese menor de 1 mL, aumentar la cantidad del medio hasta que 1 mL quede lo suficientemente diluido para evitar la inhibición del crecimiento. En el caso de sólidos que no son fácilmente solubles o dispersables, si la cantidad es menor de 50 mg, aumentar la cantidad de medio hasta que los 50 mg del producto resulten lo suficientemente solubles para evitar la inhibición del crecimiento. En ambos casos, usar la relación de producto y medio de cultivo establecida de esta manera para la prueba de esterilidad.

Tabla 4- Microorganismos para las pruebas de promoción de crecimiento y bacteriostasis y fungistasis

Bacterias aeróbicas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134) ⁽¹⁾
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ó <i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275 ATCC 9371
Bacteria anaerobia	
<i>Clostridium sporogenes</i> ó <i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 ó ATCC 11437, NBRC 14293 ATCC 8482
Hongos	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Área de siembra

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

Los sanitizantes/desinfectantes usados deben estar validados utilizando microorganismos de cepas de colección y de cepas salvajes.

Se deben monitorear microbiológicamente las superficies y el ambiente, así como el personal involucrado en los ensayos. ⁴

Personal

Los operadores, deben estar equipados con ropas adecuadas y estériles, similares a las utilizadas en áreas de trabajo aséptico. El personal que realice el ensayo debe poseer suficiente experiencia y la interpretación de los resultados deberá hacerlo una persona con estudios de microbiología o se haya adiestrado en ello.

Durante el ensayo deben desinfectarse las manos enguantadas regularmente, no deben realizar movimientos bruscos, ni realizar el ensayo impidiendo el libre flujo de aire de la cabina de flujo laminar. ⁴

Procedimiento

El ensayo debe ser realizado bajo campana de flujo laminar, el cual debe estar sometido a controles periódicos.

Antes de comenzar el ensayo se deben identificar las muestras, limpiar la superficie exterior de los envases con un agente descontaminante adecuado sumergiéndolas en un recipiente con la solución del agente. Si esto no fuera posible se deben rociar con el agente descontaminante. Todos los envases deben abrirse siguiendo técnicas asépticas.

Si el contenido de los viales fuera envasado al vacío, se introducirá en ellos aire estéril por medio de un dispositivo adecuado, por ejemplo: una aguja hipodérmica estéril a la cual se adosa un filtro esterilizante.

Se deben incubar, juntamente con los frascos/tubos sembrados con las muestras, para ambos medios de cultivo, controles negativos y un “blanco” del ensayo utilizando los mismos materiales, utensilios, membranas y líquidos de disolución y lavado que los empleados con las muestras.

Método directo

Se utiliza para:

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

Se inocular o agrega la muestra directamente en ambos medios de cultivo tal que el volumen de la muestra no sea mayor al 10% del volumen del medio de cultivo, a menos que lo indique la monografía del producto. Se emplea cuando el producto en sí no posee inhibidores que alteren la efectividad del mismo.

Si el producto a ser ensayado posee actividad antimicrobiana, se puede llevar a cabo, colocando en el medio de cultivo un agente neutralizante o diluyendo en una cantidad suficiente de medio de cultivo. Cuando hay que utilizar un volumen grande de muestra se puede preparar el medio de cultivo más concentrado.

Líquidos no filtrables

Transferir asépticamente, a partir de los envases originales, el volumen de muestra especificado en la Tabla 2, utilizando pipetas o jeringas con agujas estériles, a los frascos o tubos con ambos medios de cultivo. Mezclar el líquido con el medio sin airear excesivamente. Examinar el medio visualmente para comprobar si hay crecimiento bacteriano al tercer, cuarto o quinto día; luego al séptimo u octavo día y el último día del período de prueba.

Líquidos oleosos

Para realizar el ensayo, preparar los medios de cultivo con el agente emulsificante apropiado según el producto a ensayar como por ejemplo una concentración de 10g/L de “Polisorbato 80”, determinando que, a la concentración usada, no posea efectos antimicrobianos significativos. Proceder como en “*Líquidos no filtrables*”.

Semisólidos (cremas, ungüentos)

Para realizar el ensayo, preparar una suspensión del producto en una solución estéril con el agente emulsificante apropiado según el producto a ensayar en una concentración de 1/10, determinando que a la concentración usada no posea efectos antimicrobianos significativos. Transferir la muestra diluida en los medios de cultivo y proceder como en “*Líquidos no filtrables*”.

Sólidos no filtrables (que no se pueden disolver o suspender)

A partir de los envases originales, transferir asépticamente la cantidad de muestra especificada en la Tabla 2, (o preparar una suspensión del producto agregando un diluyente estéril). Transferir el material así obtenido a 200 mL del Medio fluido de tioglicolato y mezclar suavemente. De la misma manera transferir la misma cantidad a 200 mL de Caldo de peptonas de soja y caseína y mezclar. Proceder como en “*Líquidos no filtrables*”.

Algodón purificado, gasa, materiales quirúrgicos y artículos relacionados

De cada paquete de algodón, gasa en rollos o vendas de gasa se tomarán con pinzas y tijeras estériles dos o más porciones de 100 mg a 500 mg de las partes internas de la muestra. Si son telas o hilos se deben usar uno

o más trozos de 5 cm cuadrados o lineales. En el caso de materiales envueltos individualmente, extraer asépticamente una sola porción de 250 mg a 500 mg o la muestra entera en el caso de artículos pequeños. Se siembran en medio suficiente que cubra las muestras. Proceder como en “*Líquidos no filtrables*”.

Dispositivos biomédicos esterilizados

Para dispositivos que, por su tamaño y forma, permitan la completa inmersión en no más de 1000 ml del medio de cultivo, puede utilizarse el método de transferencia directa sumergiendo el dispositivo completo en el medio apropiado siempre que el lumen, o el interior del material esté lleno con medio de cultivo.

Cuando a causa del tamaño y forma de un artículo no pueda llevarse a cabo la prueba de esterilidad por inmersión en no más de 1000 ml del medio de cultivo, tomar la parte más difícil de esterilizar y probar esa porción o, si fuera posible, tomar dos o más partes de las porciones más internas del artículo. Transferir en forma aséptica estas porciones al número adecuado de recipientes con no más de 1000 ml de medio e incubar. Proceder según se indica en *Líquidos no filtrables*.

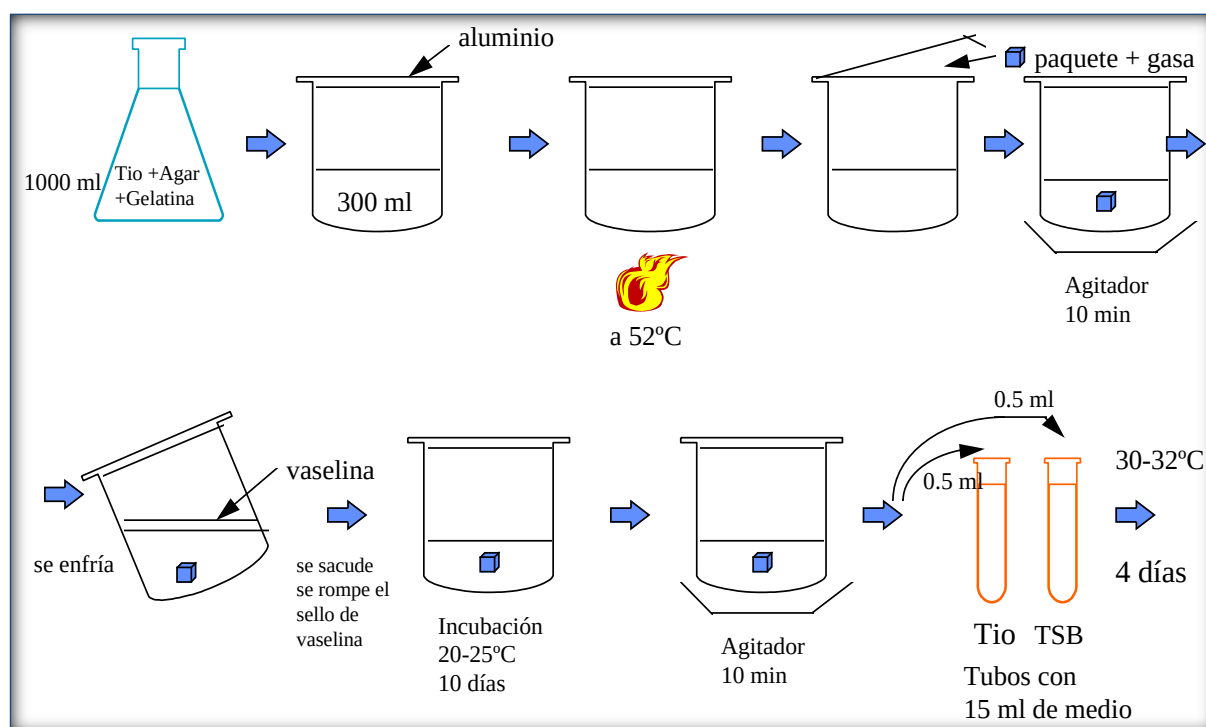
Jeringas estériles vacías

Se debe demostrar fehacientemente que la superficie externa de la aguja (que toma contacto con el tejido del paciente) es estéril. En el caso de jeringas vacías con aguja, proceder según se indica en *Dispositivos biomédicos esterilizados* o succionar el medio de cultivo o el diluyente a través de la aguja, si la jeringa no tiene aguja realizar la operación colocando una aguja estéril para este propósito y vaciar posteriormente el contenido en el medio adecuado o utilizar el *Método de filtración por membrana*, continuar con el ensayo como en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

Gasa con vaselina

Para este tipo de producto preparar el Medio fluido de tioglicolato y agregar 1 gramo de agar y 5 gramos de gelatina por litro de medio de cultivo. Transferir 300 mL del medio de cultivo a un frasco estéril con tapa, colocar en un baño a 52°C, luego inocular las muestras, agitar durante 10 minutos, enfriar, sacudir el frasco suavemente, rompiendo la capa de vaselina, incubar durante 10 días de 20 - 25°C. Al término de la incubación, agitar durante 10 minutos, tomar alícuotas de 0,5 mL e inocular tubos con Medio fluido de Tioglicolato y Caldo de peptonas de soja y caseína, como se observa en la Figura 1, incubar durante 4 días a 30 - 32 °C.

Figura 1: Procedimiento para el ensayo de esterilidad de gasa con vaselina.



Método de Filtración por Membrana

Se utiliza para:

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

En este método se emplea una unidad de membrana filtrante que consiste en un sistema que posibilita el manipuleo aséptico de las muestras a analizar, permitiendo la remoción aséptica de la membrana y su incorporación al medio de cultivo, o un sistema donde el medio pueda ser agregado y la membrana incubada “in situ”. (Figuras 2, 3 y 4).

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



Figura 2. Fotografía Cortesía de MerckMillipore



Figura 3. Fotografía Cortesía de MerckMillipore



Figura 4. Fotografía Cortesía de MerckMillipore

Líquidos miscibles en vehículos acuosos

Transferir asépticamente los volúmenes requeridos para ambos medios, según la Tabla N° 2, directamente a uno o dos embudos con membrana filtrante o a un frasco colector estéril cuyo contenido total se vuelca en la unidad filtrante. Si los líquidos son viscosos y difíciles de filtrar, se pueden emplear más de dos equipos y en tales circunstancias se incuban en cada medio, la mitad del número de membranas empleadas, cuidando que los volúmenes y el número de envases se ajusten a las condiciones indicadas. Si el producto tiene propiedades bacteriostáticas o fungistáticas, lavar la membrana o membranas con tres porciones de 100 ml de la Solución A. Retirar asépticamente la membrana o membranas de sus respectivos soportes (si se ha usado una sola membrana, cortarla por la mitad). Sumergir cada mitad, o cada membrana entera según corresponda en los medios de cultivo correspondientes e incubar.

Líquidos inmiscibles en vehículos acuosos

Transferir asépticamente el volumen requerido para ambos medios según se indica en la Tabla 2, directamente a uno o dos embudos con membrana filtrante o en frascos colectores estériles cuyo contenido se vuelca en la unidad filtrante. De esta manera, la membrana representa el contenido de los 20 envases filtrados. Puede incubarse media membrana en cada medio. Inmediatamente, filtrar con ayuda de vacío o presión.

Si la sustancia es un líquido viscoso o una suspensión que no se adapta a la filtración rápida, agregar asépticamente suficiente diluyente al líquido recolectado de todos los envases para aumentar la velocidad de filtración. Si la muestra a ensayar tiene propiedades bacteriostáticas o fungistáticas o posee algún conservador, lavar el filtro de 1 a 3 veces con 100 ml de Solución A. Si la sustancia de prueba contiene lecitina, reemplazar la Solución A por Solución D. Al finalizar la filtración y el lavado, proceder con la membrana o membranas según se indica en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*, comenzando donde dice: "Retirar asépticamente la membrana".

Sólidos filtrables

Tomar una cantidad del producto sólido (o una solución o suspensión del producto, preparada con diluyente estéril agregado al envase primario) correspondiente a no menos de la cantidad indicada en la Tabla 2. A menos que se especifique otra cosa en la monografía respectiva, el número de envases a analizar es el mismo especificado en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*. Transferir la muestra en forma aséptica a un recipiente que contenga 200 ml de *Solución A* y agitar hasta disolución.

Si la muestra no se disuelve totalmente, usar 400 ml de la *Solución A* o dividirla en 2 porciones iguales y disolver cada una en 200 ml de la mencionada solución. Transferir asépticamente la solución o soluciones a uno o dos sistemas filtrantes y filtrar con la ayuda de vacío o presión.

Proceder según lo indicado en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos* comenzando donde dice: "Si el producto tiene propiedades bacteriostáticas".

Aceites y líquidos oleosos

Utilizar la cantidad de muestra indicada en las Tablas 2 y 3 para cada medio de cultivo. Filtrar los aceites y soluciones oleosas de baja viscosidad sin diluir por una membrana (o dos) perfectamente seca. Filtrar los aceites viscosos diluyendo, si es necesario, con un diluyente estéril apropiado como el miristato de isopropilo, demostrando que no tiene propiedades antimicrobianas. Permitir que el aceite penetre la membrana por su propio peso y filtrar aplicando presión o vacío. Mantener la membrana filtrante cubierta con líquido para una máxima eficiencia de filtración. Lavar la membrana con un diluyente apropiado tal como la *Solución K*, al menos tres veces con alícuotas de 100 mL cada vez. La solución de lavado puede contener un emulsificante como "Polisorbato 80" en una concentración de 10gr/L. Proceder con la membrana o membranas según se indica en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*, comenzando donde dice: "Retirar asépticamente la membrana".

Semisólidos (cremas, ungüentos)

Utilizar la cantidad de muestra indicada en las Tablas 2 y 3 para cada medio de cultivo. Los productos semisólidos con una base grasa y las emulsiones agua/aceite pueden ser diluidas con una solución al 1 % de miristato de isopropilo calentando hasta 40°C en casos especiales se puede llegar a calentar hasta 44°C. Filtrar tan rápido como sea posible y proceder como en *aceites y soluciones oleosas*.

Aerosoles estériles

Para aerosoles líquidos, colocar los envases en una mezcla de alcohol y hielo seco a una temperatura no mayor de -20 °C durante una hora aproximadamente. Si es posible, dejar escapar el propelente antes de abrir asépticamente los envases, y transferir el contenido a un frasco estéril. Agregar al frasco 100 ml de *Solución D* y mezclar suavemente. Proceder según se indica en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos* o *Líquidos inmiscibles en vehículos acuosos según corresponda*.

Dispositivos médicos esterilizados

Los dispositivos que tienen pasos o conductos estériles se ensayan mediante filtración por membrana según se describe a continuación:

Pasar asépticamente un volumen suficiente de *Solución D* a través de no menos de 20 dispositivos, de manera de recuperar no menos de 100 ml de cada dispositivo. Recoger la solución en recipientes estériles y filtrar el total del volumen recogido a través de embudo(s) con membrana filtrante, según se indica en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*, comenzando donde dice: "Retirar asépticamente la membrana".

Si el dispositivo es grande y los lotes están formados por un número pequeño de unidades, la prueba se realizará con un número apropiado de unidades como se describe para casos similares en la sección *Dispositivos médicos esterilizados en Método de transferencia directa*.

Jeringas prellenadas

Drenar el contenido de cada jeringa a través de la aguja, si está colocada; o directamente si no tiene aguja colocada. Proceder según lo indicado en *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

Observación e interpretación de resultados ^{1,2}

Los envases sembrados se observan a intervalos regulares, con el fin de detectar crecimiento microbiano por evidencia macroscópica.

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

Conclusión:

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

Si se observa desarrollo microbiano, pero si los monitoreos de las instalaciones donde se lleva a cabo el ensayo, de los materiales empleados, la técnica empleada y los controles negativos indican que el procedimiento del análisis fue inapropiado, el ensayo se declara nulo y debe repetirse. Si se observa desarrollo microbiano confirmado microscópicamente y no existen evidencias suficientes para anular el ensayo, el producto no cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad.

El ensayo no es válido cuando se demuestra que:

- a) Los registros del monitoreo microbiológico de la sala y equipo que se utilizaron en la ejecución del ensayo presentan una falla
- b) La revisión del procedimiento del ensayo presenta una falla.
- c) Se observa crecimiento microbiano en los controles negativos (uno o ambos).
- d) Puede comprobarse que el microorganismo aislado en el ensayo, es inequívocamente producto de una falla en los materiales o en las técnicas empleadas.

Si el ensayo se declara inválido, se puede repetir con la misma cantidad de muestras. Si no se observa desarrollo, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad. Si se observa desarrollo microbiano, el producto no cumple con el ensayo de esterilidad.

En aisladores - Cuando el ensayo de esterilidad se realiza en aislador, el producto cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad cuando no se observa desarrollo microbiano. Cuando se observa desarrollo microbiano y es confirmado microscópicamente, el producto no cumple con los requisitos del ensayo de esterilidad. El ensayo no se considera válido cuando se demuestra pérdida de integridad física del aislador, por falla en la técnica aséptica o por materiales no estériles dentro del aislador. En estos casos se debe repetir el ensayo.

La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por el procedimiento descrito, confirma que el producto satisface los requisitos de la prueba, lo cual no es razón suficiente, para suponer la total esterilidad del lote, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo. Por esta razón deben efectuarse las validaciones de los procesos de esterilización y de llenado aséptico y un continuo entrenamiento del personal que efectúa tanto las tareas de producción como de control.³

Tecnologías para el ensayo de esterilidad. Desde las tradicionales avanzando a las automatizadas.

No fue hasta 1936 en que la décimo primera edición de la farmacopea americana USP instauró el método de inoculación directa como prueba válida para el control de esterilidad. Pese a las distintas dificultades que este método incorporaba, fue reemplazado recién en la décimo octava edición en 1970. Este método más moderno trajo consigo una serie de ventajas muy aceptadas por la industria; entre ellas mayor sensibilidad, menor medios de cultivo y tiempos de incubación. Pese a estas ventajas, el método por membrana filtrante o embudo abierto tiene algunos defectos. Es un método susceptible a errores por manipulación o contaminación en los procesos de filtración de la muestra, enjuague, transferencia de la membrana y/o división de la misma. Una manera efectiva de reducir estos falsos positivos es eliminar la transferencia abierta del producto y la manipulación de la membrana, dando origen a diseños más cerrados y automatizados.⁵

El ensayo de esterilidad es uno de los pasos más importantes en la comercialización de un producto

farmacéutico. Los falsos positivos y negativos, fallas del equipo y los errores humanos pueden costar tiempo, dinero, y finalmente la continuidad del producto farmacéutico en el mercado.

Existen sistemas semiautomáticos que ofrecen ventajas respecto a los métodos tradicionales de test de esterilidad por filtración manual recién comentados.

Entre los sistemas más automatizados, podemos citar a aquellos que constan de una bomba peristáltica controlada por un software que se utiliza para la transferencia segura y uniforme de muestras de productos farmacéuticos estériles, en sus diferentes presentaciones y tipos de envase, a las unidades de filtración.⁶ Ver Figura 5.



Figura 5: La barra soporte para las muestras es desmontable y puede sostener viales o bolsas de plástico desde 100 ml a 1,5 l.
Fotografía Cortesía de MerckMillipore

La bomba y las unidades (*canisters*) ofrecen fiabilidad y uniformidad para el ensayo de esterilidad. Los equipos más modernos basados en esta tecnología, permite desde una computadora desarrollar procedimientos operativos estándar (SOP) que pueden ser incluidos en el programa de la bomba. El analista de un modo automático sólo necesita seleccionar en el panel de control el SOP apropiado para la muestra de producto a analizar. El sistema guiará al analista en cada paso, actuando como una guía formativa, y respaldando de este modo las buenas prácticas de análisis en el laboratorio. Los diversos pasos del procedimiento, la velocidad correspondiente de la bomba y la información relacionada se muestran en el panel de control, mejorando la repetibilidad y fiabilidad. Los analistas pueden seleccionar el modo manual o automático. En el modo manual, la bomba pedirá al analista que introduzca datos en cada paso del procedimiento.

Ensayo de esterilidad controlado.

Esta bomba avanzada y automática, acelera y facilita el ensayo de esterilidad. Un procedimiento dirigido de 5 pasos garantiza un rendimiento uniforme y preciso al mismo tiempo que reduce el tiempo total del ensayo. Diseñada ergonómicamente para un funcionamiento y limpieza sencillos, la bomba se ajusta al aislador o bien para su uso en la campana de flujo laminar del área estéril. Su diseño asegura la descontaminación perfecta

dentro de los aisladores o campanas, eliminando el riesgo de falsos positivos por este motivo. Es posible montarlo y desmontarlo fácilmente durante las tareas de mantenimiento. La bandeja de drenaje, así como las superficies de acero inoxidable pulido 316L, el cabezal de la bomba y la barra soporte pueden limpiarse fácilmente con la mayoría de los agentes sanitizantes. Ver Figuras 6 y 6': pasos 1 al 5.



Paso 1- Coloque los tubos de la unidad de filtración en el cabezal de la bomba y pulse el botón para cerrarlo



Paso 2- Filtre cantidades equivalentes de producto por ambos canisters sin exponer el fármaco al ambiente.



Paso 3-Lave las membranas de filtración.



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

Figura 6: Pasos 1, 2, 3 y 4
-Fotografías cortesía de MerckMillipore-



Paso 5- Incube y examine los canisters para detectar si hay contaminación según las farmacopeas

Figura 6': Paso 5
-Fotografía Cortesía de MerckMillipore-

Microbiología rápida

Las tecnologías de microbiología rápida cada vez tienen más interés y aceptación en la industria farmacéutica, ya sea en etapas de desarrollo, producción o análisis; así lo muestra la búsqueda de un ensayo de esterilidad alternativo al convencional, que permita ganar versatilidad, rapidez y disminuir los costos.

Han surgido nuevas tecnologías como la Bioluminiscencia que aparece como una alternativa de control microbiológico que proporciona resultados rápidos y sensibles basados en la reacción por ATP con la enzima luciferasa presente en todos los organismos vivos.

Las autoridades sanitarias también están tomando participación en el tema, buscando reglamentar la validación de estos métodos rápidos. A modo de ejemplo, se cita el documento de la FDA sobre validación de test de esterilidad por método rápido para productos de terapia celular y genética.⁷

Ensayo de Esterilidad: Tecnología de Aisladores

En los últimos años la tecnología de aisladores está siendo aplicada con muy buenos resultados en la Industria Farmacéutica. Ésto se debe principalmente, al notable desarrollo tecnológico alcanzado por varias firmas constructoras y a las innegables ventajas que esta tecnología proporciona en la manipulación de materiales estériles, o para la protección del hombre durante la manipulación de sustancias tóxicas. Los aisladores pertenecen a la tecnología de barreras. Estas pueden ser cualquier objeto material que separe o sirva de barricada, o cualquier obstáculo físico de contención. En los procesos farmacéuticos se considera barrera cualquier medio de protección incluyendo cortinas en las salas limpias, guantes, anteojos, máscaras faciales, cabinas de seguridad biológicas, etcétera.

Dentro de esta tecnología los aisladores no son un nuevo concepto sino un nuevo potencial, dado por logros en su diseño, como es el desarrollo de sistemas de transferencia capaces de mantener las condiciones de aislamiento, equipamiento adecuado para el intercambio del aire y capacidad para la esterilización automática.

Aunque los aisladores pertenecen a la tecnología de barreras, no necesariamente toda barrera es un aislador. Estos son recintos herméticos en los cuales no hay contacto directo entre el medio interno y el externo. Las transferencias de materiales se realizan a través de sistemas que mantienen el aislamiento, y actúan como una barrera efectiva entre el operador y el área de trabajo efectuándose las operaciones de forma tal que se evite el

contacto directo entre el hombre y el material manipulado. El aire es suministrado a través de filtros de alta eficiencia, pudiéndose filtrar, de ser necesario, el aire que es expulsado al exterior. Son sistemas esterilizables con un alto nivel de aseguramiento de la esterilidad y por sus características son capaces de mantenerla por períodos prolongados de tiempo.⁸

Por las características de esta tecnología se han logrado muy buenos resultados con su aplicación en diferentes industrias. En la Industria Farmacéutica, y especialmente en la manipulación de materiales estériles, se han logrado significativos beneficios por la mejoría del ambiente de trabajo, así como una eficiente contención de materiales tóxicos.

Todas estas aplicaciones tienen un objetivo común. Esto puede resumirse en el deseo de alcanzar un microambiente seguro, proteger al hombre, al medio ambiente y/o al producto, para alcanzar ganancias de energía y de otros costos, y para minimizar los ambientes protegidos.

Descripción del aislador

Aunque se comercializan aisladores específicos para algunas aplicaciones generalmente se diseñan a solicitud del cliente. Estos son adaptados a los requerimientos de la aplicación que estará en dependencia de la actividad realizada, del equipo al cual se adaptará, de la cantidad de operarios o analistas, de los accesos necesarios para la manipulación, de las intervenciones necesarias durante el proceso de manufactura o análisis, o de los materiales que se manipularán.

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

Los aisladores estarán constituidos por 4 partes fundamentales:

- Sistema de tratamiento de aire.
- Sistemas para la manipulación.
- Sistemas para la transferencia de materiales.
- Paredes y mesa de trabajo.

Sistema de tratamiento de aire. Está constituido por ventilador, conductos y filtros. Este sistema permite el suministro de aire a través de prefiltros y filtros de alta eficiencia como los filtros HEPA y ULPA. El flujo de aire puede ser mediante flujo turbulento o unidireccional. El aire podrá ser recirculado o expulsado totalmente pudiéndose encontrar filtración terminal en casos donde se manipulan materiales peligrosos. Este sistema permite el acople a equipos que suministran agentes químicos para la sanitización automática del área interna del aislador.^{8,9}

Sistemas para la manipulación. Permite la ejecución de las operaciones sin que el operario esté en contacto directo con el producto; esto se logra mediante mangas-guantes, medias escafandras o escafandras. La selección de una u otra variante estará en dependencia de las características de la operación y la necesidad de que ésta se realice de forma confortable.^{8,9}

Sistemas para la transferencia de materiales. A través de estos sistemas se realiza la transferencia de materiales. Estos pueden ser desde un sistema SAS constituido por 2 puertas con juntas herméticas, hasta RTPs (sistemas de transferencia rápidos). Estos últimos son sistemas más sofisticados y eficientes, los cuales permiten efectuar la transferencia de forma más segura minimizando el contacto del medio interno y externo. Los RTPs también permiten el acople entre aisladores.

En la práctica se encuentran ambas variantes con buenos resultados y su utilización está determinada por las características de la operación, las exigencias de aislamiento y los costos particulares de estos 2 sistemas, siendo el RTPs el más costoso. En las líneas automáticas de llenado, para el suministro de materiales pueden encontrarse aberturas utilizadas como sistemas de transferencias para grandes volúmenes de materiales; en estos casos el diferencial de presión y el medio circundante deben permitir

mantener el aislamiento^{8, 9}

Paredes y mesa de trabajo. Éstas pueden ser de diferentes materiales como plásticos rígidos o flexibles, cristal y acero inoxidable.^{8, 9} Estos materiales poseen diferentes grados de resistencia química y física, así como diferentes costos. Un análisis de los requerimientos de la aplicación permitirá satisfacer las necesidades sin incurrir en costos innecesarios.¹⁰

Aplicaciones en la Industria Farmacéutica

Pruebas de esterilidad. La utilización de aisladores para esta prueba resulta ventajosa ya que incrementa el aseguramiento de la esterilidad del ambiente de trabajo, por tal motivo se reducen los falsos positivos. Las repuebas pueden ser reducidas desde 0,1 a 0,01 % comparado con su ejecución en un área convencional para esta prueba. Si se utiliza un sistema correctamente diseñado para la "sanitización" del aislador, muestras y materiales, las posibilidades de falsos positivos deben tender a cero y por tanto la ejecución de las repuebas en estas condiciones debe ser cuestionada.

Algunos autores, principalmente fabricantes de aisladores, plantean que no se requieren áreas clasificadas, y por ello se elimina la utilización de ropa estéril lo que disminuye los costos de inversión.⁸

El sistema para la ejecución de esta prueba consta de un aislador de trabajo, el cual puede estar acoplado directamente a un autoclave de doble puerta a través de un aislador de interfase, o puede no estar acoplado y recibir los materiales estériles a través de aisladores de transporte. Algunos autores plantean que la segunda variante simplifica el sistema y es más fácilmente validable.¹¹

Algunas firmas comercializan aisladores para pruebas de esterilidad, estas ofertan variantes que van desde aisladores flexibles y con flujos turbulentos hasta aisladores rígidos y flujos unidireccionales.² Se plantea que la segunda alternativa no proporciona ventajas técnicas adicionales y es menos económica, aunque en la primera variante no se debe perder de vista la renovación de la folia cada 3-5 años y la consiguiente calificación del equipo.^{8, 9, 12}

Ventajas:¹³

- *Eliminación del personal del área de procesamiento aséptico.* Una de las ventajas más significativas de esta tecnología es la eliminación de la intervención directa del hombre en el área de trabajo, el cual es el mayor vector de contaminación.
- *Esterilización en lugar de "sanitización".* La utilización de sistemas automáticos permite lograr un ambiente estéril dentro del aislador de forma más eficiente y segura a diferencia de la "sanitización" que se realiza en las áreas limpias convencionales.
- *Reducción del monitoreo ambiental.* Al lograrse condiciones de aislamiento y conservarlas durante la manipulación se logra mantener la esterilidad por períodos de tiempo mayores que en las áreas limpias convencionales, con esto, puede reducirse la frecuencia del control ambiental.
- *Simplificación de las instalaciones.* En muchas aplicaciones se logra reducir o prescindir de áreas clasificadas o disminuir la complejidad de estas para la manipulación de productos de alto riesgo.
- *Simplificación del vestuario.* La simplificación de las instalaciones deriva una simplificación del vestuario, ya que este deberá tener características acordes con la clasificación del local y en muchos casos se logra prescindir de la ropa estéril. Esto simplifica, además, el tratamiento previo de la ropa y el tiempo requerido por el personal para efectuar los cambios de vestuario.
- *Reducción de los costos.* Aunque los aisladores pueden tener una incidencia marcada en el presupuesto de la inversión, los costos se reducen al permitir la simplificación de la instalación, permitiendo además, una significativa reducción de los costos de explotación y la puesta en marcha puede ejecutarse en un período breve. Esta tecnología puede adaptarse a instalaciones ya existentes dada su flexibilidad.
- *Contenedor de productos tóxicos.* Al actuar como un recinto hermético permite una eficiente protección del hombre y del medio ambiente, además se logra una sensible disminución de las áreas críticas y de la

generación de residuales por concepto de limpieza de dichas áreas.

- Con esta tecnología se logra conciliar convenientemente requerimientos de protección y contención, específicamente en el caso de manipulación de productos estériles tóxicos.

Desventajas:

A pesar de lo ventajosa que resulta esta tecnología su aplicación no se ha generalizado todo lo rápido que se podría esperar. A continuación relacionamos algunos aspectos que impiden su total aceptación.

- *Inquietudes y conflictos en las afirmaciones del vendedor.* Al ser esta una tecnología en desarrollo no se dispone aún de estándar y se encuentran significativas contradicciones entre los fabricantes, como es el dilema de utilizar flujo unidireccional o turbulento, utilizar aisladores rígidos o no para algunas aplicaciones y selección del agente esterilizante.
- *Aparición de aisladores no industriales.* En una industria tan conservadora como la Farmacéutica donde es común encontrar superficies de acero inoxidable, con pulido espejo y construcción de apariencia sólida, resulta contradictorio encontrar aisladores con apariencia casi de juguete, donde algunos la cambian al variar la presión. Las construcciones plásticas y de fibra de vidrio pueden presentar cortaduras o rasguños.
- *Dificultades relacionadas con la esterilización.* Es importante tener en cuenta el agente esterilizante a utilizar, así como su compatibilidad con los materiales empleados en su construcción y con equipamiento que se ubicará dentro del aislador a fin de evitar que sean atacados.
Otra dificultad radica en la necesidad de remover el agente esterilizante hasta niveles aceptables luego de la esterilización y la frecuente retención que se produce de este por parte de algunos materiales utilizados, principalmente en mangas-guantes y escafandras.
- *Diseño de los sistemas de facilidades auxiliares existentes para las áreas de procesamiento aséptico convencionales.* La Industria de Parenterales tiene un gran cúmulo de inversiones en las áreas de procesamiento aséptico convencionales. Un cambio radical en los conceptos de estas instalaciones podría dar lugar a un gran número de estas instalaciones obsoletas. Las modificaciones necesarias para adaptar el equipamiento existente y sistemas soportes a las operaciones del aislador deben ser consideradas, así como la extensión de las inversiones en equipos nuevos que pudieran ser necesarios para introducir los cambios. La recuperación de la inversión tiene un gran peso para el cambio a la tecnología de aisladores.
- *Escepticismo de las agencias reguladoras.* A pesar de ser claras las ventajas de esta tecnología, por su naturaleza, esta industria, tiende a preocuparse por cómo puedan reaccionar las Agencias Reguladoras. La novedad del concepto de barrera, controversias sobre el ambiente que rodea al aislador y la ausencia de algunos estándares para la validación y uso, están entre las razones más firmes que han frenado en algunos casos la adopción de esta tecnología por temor a posible criticismo de las agencias reguladoras.

Cambios necesarios en la filosofía y metodología operacional.

El uso de aisladores sugiere cambios en la forma de operar, algunos cambios presentan ventajas simples y claras como la ausencia de ropa estéril en algunos casos, pero otros son más problemáticos. Las dificultades para la transferencia de materiales al aislador son significativas, así como la necesidad de esterilizar más que "sanitizar" los materiales a ser introducidos en el aislador, por lo que es muy importante la compatibilidad de este con los agentes esterilizantes.

Los métodos de monitoreo ambiental y la frecuencia pueden requerir alteración. Se requerirá la validación de la esterilización en materiales donde antes sólo se requería "sanitización". Muchos de estos cambios son debidos a la sustitución de un ambiente limpio por uno estéril.^{12, 14}

Esterilización.

Para lograr y mantener el ambiente estéril dentro del aislador se debe esterilizar el espacio interno y todos los materiales que se transfieren. Una vez esterilizados los materiales estos no deben salir del ambiente estéril de

los aisladores. Para lograrlo se acoplan aisladores a la salida de las autoclaves y hornos, o de lo contrario, se utilizan aisladores de esterilización donde se esteriliza el exterior de los materiales ya esterilizados previamente. Para mantener estas condiciones de esterilidad no debe perderse de vista la integridad del aislador, y como parte de este, la de los sistemas de transferencia.

Para la esterilización de los aisladores se utiliza ácido peracético, formaldehído, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno, entre otros. La selección de uno u otro estará determinada por la compatibilidad del agente esterilizante con los materiales con los que se pondrá en contacto. Es determinante la validación del método empleado, haciéndose hincapié en la remoción del agente esterilizante hasta niveles permisibles. En el mercado se dispone de sistemas automáticos que permiten ejecutar la esterilización de forma validable y segura^{8, 10, 15}

Limpieza.

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

Requerimientos del área en que se ubica el aislador.

Los aisladores pueden ubicarse en áreas desde grado B hasta D.

Los requerimientos del medio circundante estarán dados por las características del aislador, como diseño, tipo de sistema de transferencia, métodos de limpieza y "sanitización", diferenciales de presión, requerimientos de mantenimientos entre otros. La selección correcta del medio circundante deberá demostrarse con la validación de los procesos, teniendo particular importancia los controles ambientales^{11, 17}

Ensayo de esterilidad de productos estériles citostáticos.

La utilización de aisladores en estas producciones en esta situación permite aprovechar dos de sus principales ventajas: aumentar los niveles de esterilidad y con ello la garantía de calidad de los productos, y lograr una efectiva protección del operario y del medio ambiente ya que permite aislar el tóxico en un área más reducida, con un diseño eficiente y adecuado, permitiendo simplificar la instalación en su conjunto.

Para esta aplicación es de vital importancia lograr una adecuada selección de los guantes a fin de evitar la "permeación del citostático". Se reporta que los guantes de látex ofrecen la mejor protección aunque son permeables para algunos de ellos. El tiempo de exposición y la cantidad de fármaco influyen en el nivel de "permeación". Se recomienda no utilizar guantes de PVC para su manipulación.^{18, 19}

La adecuada limpieza e inactivación de los residuales generados, integrado un correcto diseño de las áreas de trabajo, complementan la eficiente protección que proporciona el aislador⁸

Liberaciones paramétricas.^{20, 21, 22, 23, 24 y 25}

Las autoridades sanitarias de los distintos países requieren que los productos estériles reúnan ciertos requerimientos de esterilidad antes de ser liberados al mercado. En muchos casos, los requerimientos para la liberación del lote están basados en el ensayo de esterilidad realizado sobre unidades del producto terminado, retiradas representativamente del lote en cuestión. Esta metodología de liberación es la tradicional y la que se ha venido utilizando durante muchos años. Más recientemente, aparecieron otros criterios posibles a tener en cuenta para la liberación al mercado de productos estériles. Estas son las "Liberaciones paramétricas".

Algunas definiciones

- La liberación paramétrica, según FDA en “Guidance for Industry de Febrero 2010”, es definida como un programa de liberación que ofrece la garantía sobre la esterilidad de un producto basándose en el control demostrado sobre puntos críticos definidos del proceso de esterilización para poder cumplir con CFR 21.211.165 (a) y 211.167(a). Bajo esta estrategia, las liberaciones al mercado de productos esterilizados terminalmente pueden ser basadas en el cumplimiento de parámetros de esterilización definidos y no en el aprobado del test de esterilidad. Reunir los requerimientos del proceso de liberación paramétrica puede proveer mayor garantía de que un lote reúna los requisitos para liberarse que la garantía lograda con el análisis de un número de unidades de producto final sometidas al ensayo de esterilidad.
- Otra definición de “EU Anexo 17 de 2001”, indica que es un sistema de liberación que ofrece la garantía de que el producto es de la calidad deseada basándose en la información recogida durante el proceso de manufactura y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura relacionadas con la liberación paramétrica.
- Según PDA, en su “Reporte técnico N° 30 de 2010”, la liberación paramétrica es un programa de liberación de la esterilidad basado en el control, monitoreo y documentación de un proceso validado de manufactura de un producto estéril, en donde la aprobación de la esterilidad está basada en el cumplimiento demostrado de parámetros de operación críticos en lugar de la realización del ensayo de esterilidad sobre el producto final.

Antecedentes

El testeo de esterilidad por cultivo microbiológico de las unidades del lote está limitado en su habilidad por detectar la contaminación debido a:

- El número pequeño de muestras requeridas para el testeo, la cual está restringida a la habilidad por capturar aquellos microorganismos dispersos en un gran volumen.
- La habilidad limitada del medio de cultivo a estimular el crecimiento de todos los potenciales microorganismos.

Estos ensayos detectarán sólo errores mayores en los procesos de manufactura que resultan en una contaminación de un número grande de unidades de producto. Sin embargo, los datos derivados de los controles en proceso de un proceso de esterilización terminal pueden proveer información más exacta acerca de la esterilidad de un producto debido a que la probabilidad de que la carga microbiológica sobreviva al proceso de esterilización en alguna unidad puede ser calculada como menor a 1 en 1.000.000.

La liberación paramétrica permite a los fabricantes reemplazar el ensayo de esterilidad de las muestras de producto final del lote por una liberación basada en criterios de aceptación de controles de parámetros de proceso identificados.

Estos parámetros, llamados parámetros críticos, son críticos para el satisfactorio proceso de esterilización y están basados en el conocimiento profundo de: el proceso, el producto, el efecto de la esterilización en el producto, y los microorganismos asociados con el producto durante la manufactura. La liberación paramétrica del lote está basada en la evidencia documentada de control de los parámetros críticos, removiendo la necesidad de testeo del producto final.

Un monitoreo de la carga a esterilizar ya sea de forma física, química o mediante indicadores biológicos en cada carga, debe estar incluida para satisfacer los requerimientos del test del laboratorio. En adición, el monitoreo de la carga de esterilización es siempre considerado un parámetro crítico del proceso. Un resultado del monitoreo de la carga esterilizada satisfactorio, el cumplimiento de los criterios de aceptación de los parámetros críticos y el tener un programa de garantía de la esterilidad bien validado, demuestra que existe un estado de control del proceso de manufactura del producto. El o los monitores de la carga deberán estar ubicados en apropiadas posiciones de modo de indicar que la carga fue expuesta al proceso de esterilización, que fue medida y registrada, cumpliendo con los criterios definidos para la liberación paramétrica. Esta o estas posiciones están determinadas basadas en la evaluación del desarrollo y calificación de los datos. La distribución y número de monitores debe ser descripta y justificada. Procesos alternativos para demostrar que la carga o parte de ella fue expuesta a la esterilización debe ser discutido con la autoridad sanitaria antes de implementar la liberación

paramétrica.

PDA ha aceptado la práctica de liberaciones paramétricas para drogas esterilizadas terminalmente por calor húmedo desde 1985. Liberaciones paramétricas descritas en la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) Q6A (ICH 2000) fueron tomadas por grupos de manufactura y regulatorios de distintos países tales como USA (PDA 1999, USP 2009), EU (PIC/S 207), EMEA 2001) y Japón (Sasaki 2002).

Evaluación del material para la aceptación de la práctica de liberación paramétrica.

El aprobado de la práctica de liberaciones paramétricas está basado en la evaluación de los parámetros críticos del proceso propuestos y en la forma en que los mismos serán controlados. Entre lo requerido se encuentra contar con ciclos de esterilización terminal de producción que demuestren ser confiables, controles microbiológicos, monitoreo de los parámetros de los ciclos de producción y control de que los mismos den resultados dentro de los límites validados establecidos.

Otro punto a considerar es la evaluación de riesgo que se haya hecho. Una evaluación de riesgo según ICH Q9 (ICH 2006), debe proveer:

- A. Estrategia corriente para el control del programa de esterilización terminal.
- B. Riesgo que las estrategias de rutina puedan fallar
- C. Mostrar cómo las experiencias de manufactura y el conocimiento fueron incorporados en la evaluación de riesgo. Herramientas de Gerenciamiento del Conocimiento y Riesgo de la Calidad pueden ser usadas en forma continua para mejorar la capacidad a través del ciclo de vida del proceso de esterilización.

A. Estrategia de control para el Programa de Esterilización terminal.

Una estrategia de control debe ser usada para asegurar que los criterios de aceptación del proceso de liberación paramétrica y el ciclo de esterilización terminal son reunidos de modo de garantizar la esterilidad del producto.

La estrategia de control debe incluir:

- Racional para justificar los métodos empleados para el monitoreo y control del proceso de esterilización terminal usado en la liberación del producto (parámetros de proceso crítico).
- Racional para justificar la selección del parámetro crítico del proceso.
- Descripción del criterio de aceptación para la liberación paramétrica.
- Descripción del producto droga y el sistema de cierre del contenedor (incluyendo el empaque secundario, si aplicara) que será parte del programa de liberación paramétrica.
- Descripción de los patrones de carga de producción propuestos y verificación de que están dentro de límites validados para el ciclo de esterilización terminal, o una declaración de que ellos no han sido cambiados desde la última validación y aprobación, si aplicara.
- Descripción del plan de monitoreo microbiológico para el producto y componentes antes de la esterilización terminal o una declaración de que el plan no ha sido cambiado desde la última validación. Estudios de resistencia al calor y detección de esporas debe ser enfatizado para el estudio de la biocarga.

B. Evaluación de riesgo, entendimiento del proceso y conocimiento previo.

Los sistemas de liberaciones paramétricas exitosos están basados en la confiabilidad de la estrategia de control del programa de aseguramiento de la esterilidad. Es recomendable que la evaluación de riesgo haga foco en el riesgo de falla de modo de lograr la probabilidad mínima de obtener una unidad no estéril para cada unidad del lote.

La evaluación de riesgo debe incluir:

- Consistencia en el funcionamiento del ciclo de esterilización terminal dentro de los límites validados.
- Una discusión del riesgo de esterilidad de los productos relativo a lo siguiente:
 - Ciclo de esterilización terminal de producción.
 - Patrones de carga de la producción.

Sistema de cierre de los contenedores, incluyendo empaque secundario, si aplicara.

- Riesgo de contaminación proveniente del ambiente. Para un programa de liberación paramétrico ya autorizado si ocurrieran cambios en los ítems arriba mencionado deberían ser informados a la autoridad competente junto con una evaluación de riesgo de la esterilidad de los productos alcanzados por este cambio. Por ejemplo, un aumento de tiempo en la esterilización, aunque el tiempo mínimo de esterilización establecido no puede ser bajado, el tiempo máximo de esterilización puede ser aumentado si los datos de estabilidad entregados justifican el cambio.
- Experiencias sobre el producto y su sistema de cierre, sobre el proceso de esterilización, riesgos de la esterilización y etapas que han sido evaluadas y controladas en su riesgo. Para un producto nuevo puede llegar a ser suficiente trabajar con el conocimiento sobre los datos de los lotes usados para el desarrollo y registro del producto.
- Una discusión previa general sobre el conocimiento, producción y experiencias de testeo de la esterilidad del producto que va a ser objeto de la liberación paramétrica.

C. Documentación para el proceso de liberación paramétrica.

La siguiente información específica es requerida:

- Descripción detallada y completa de los ciclos de esterilización terminal actuales más relevantes.
- Identificación de los parámetros críticos de proceso para los productos propuestos para la liberación paramétrica, incluyendo los límites máximos y mínimos para dichos parámetros. Los parámetros críticos deben mostrar que caen dentro de los límites que han sido validados y aprobados.
- Reconocimiento que la adherencia a los parámetros críticos al programa de liberación paramétrica sustituirá a la realización del test de esterilidad como criterio de liberación del producto final, no pudiéndose volver a él en caso que no se cumplan los criterios de liberación paramétricas. Dado este caso la carga esterilizada debe ser rechazada.
- Una descripción del monitoreo de la carga del esterilizador indicando: tipo de monitor propuesto, cómo el monitor de la carga será usado y analizado, qué funciones se van a medir y el racional para la ubicación del monitor.
- Documentación del sistema de control para verificar la exposición de la carga al proceso de esterilización.
- Revisión de los certificados de análisis o documentos de liberación del lote de cada producto sujeto a liberación paramétrica para indicar que el test de esterilidad es reemplazado por la liberación paramétrica.

Las liberaciones paramétricas en Argentina

Una de las normativas argentinas es la Disposición ANMAT N° 2819/2004, basada en las recomendaciones de la OMS. Esta norma incluye:

- BPF para Elaboradores, Importadores / Exportadores de Medicamentos
- Consideraciones Generales, Gestión de Calidad, 18 Capítulos y 11 Anexos.

En el Anexo III de la disposición ANMAT 2819/2004 se trabaja el tema “Liberación Paramétrica” que se trata a continuación.

Definición y exigencias en Argentina

Es un sistema de liberación que ofrece la garantía de que el producto es de la calidad deseada basándose en la información recogida durante el proceso de fabricación y en el cumplimiento de exigencias específicas de las Buenas Prácticas de Fabricación.

Para practicar la liberación paramétrica se debe cumplir con las exigencias básicas de las Buenas Prácticas de Fabricación, un sistema de Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control (HACCP) implementado, los anexos aplicables y las directrices que se incluyen a continuación; y los laboratorios deben ser autorizados por la ANMAT para tal fin.

Las liberaciones paramétricas en general

Se acepta que un conjunto completo de ensayos y controles durante el proceso podría garantizar que el producto terminado cumple las especificaciones. La liberación paramétrica puede ser autorizada para determinados parámetros específicos como alternativa a los ensayos rutinarios de los productos terminados.

La autorización de la liberación paramétrica debe ser concedida, denegada o retirada por la Autoridad Sanitaria Nacional. La liberación paramétrica se debe practicar en presencia, supervisión y aprobación de una comisión de inspectores de las Buenas Prácticas de Fabricación.

Liberaciones paramétricas para productos estériles en Argentina

Solamente trata la parte de la liberación paramétrica relacionada con la aprobación rutinaria de productos terminados sin llevar a cabo un ensayo de esterilidad. La eliminación del ensayo de esterilidad solamente será válida si se demuestra satisfactoriamente que se han alcanzado las condiciones predeterminadas y validadas de esterilización. El laboratorio debe contar con un sistema de garantía de la esterilidad.

La liberación paramétrica se podrá autorizar si los datos que demuestran la correcta elaboración del lote aportan, por sí solos, la garantía suficiente de que el proceso fue diseñado y validado para garantizar la esterilidad del producto.

La liberación paramétrica solamente es aceptable para productos esterilizados mediante esterilización terminal por calor húmedo, en su envase final.

El fabricante debe contar con un historial de cumplimiento adecuado de las normas de Buenas Prácticas de Fabricación. Al evaluar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación, deben tenerse en cuenta el historial de no esterilidad de los productos y los resultados de los ensayos de esterilidad, llevados a cabo sobre el producto en cuestión, junto con los productos procesados mediante el mismo sistema de garantía de la esterilidad.

Es poco probable que un producto completamente nuevo se considere adecuado para la liberación paramétrica, ya que los criterios de aceptación incluirán un período de resultados satisfactorios del ensayo de esterilidad. Sin embargo, puede darse el caso de que un producto nuevo no sea más que una variación menor, desde el punto de vista de garantía de la esterilidad, y que se puedan considerar aplicables por tanto, los datos existentes sobre el ensayo de esterilidad de otros productos.

El diseño y la validación original del producto deben garantizar que se mantiene su integridad en todas las condiciones operativas.

El sistema de control de cambios debe exigir la revisión de los cambios por parte del personal de garantía de la esterilidad.

Debe estar implementado un sistema de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (HACCP) en el sistema de garantía de la esterilidad centrado en una evaluación de la aprobación como si se tratara de productos no esterilizados.

La limpieza y sanitización de las partes de los equipos, utensilios y todo el material que esté en contacto directo con el producto deben estar validadas.

Las áreas de elaboración del producto deben estar calificadas como indica la legislación vigente para la exigencia del producto.

En los lugares de la elaboración y de la esterilización debe estar presente un profesional calificado en microbiología con experiencia en la garantía de la esterilidad y la persona autorizada.

Debe existir un sistema para controlar la posible contaminación microbiana en el producto antes de la esterilización.

No debe existir la posibilidad de que se mezclen productos esterilizados con productos no esterilizados, lo cual se debe garantizar mediante barreras físicas o sistemas electrónicos validados.

Se debe verificar que los protocolos de esterilización cumplan con las especificaciones mediante dos sistemas independientes, como mínimo. Estos sistemas pueden ser dos personas o un sistema informático validado más una persona.

Antes de la aprobación de cada lote de producto se deben confirmar los siguientes puntos adicionales:

- En el equipo de esterilización utilizado se han realizado todas las tareas de mantenimiento planificadas y las verificaciones rutinarias.
- Todas las reparaciones y modificaciones han sido aprobadas por el responsable de garantía de la esterilidad y la persona autorizada.
- Todo el instrumental debe estar calibrado.
- El procedimiento de esterilización posee una validación actualizada para la carga de producto procesado.
- La descripción del proceso de esterilización incluyendo el tipo de ciclo, plantilla de registro, especificaciones de los parámetros del ciclo (tiempo, temperatura, presión, Fo) e indicadores químicos.

Las especificaciones y métodos o procedimientos aplicados para los controles en proceso por ejemplo pre-esterilización, carga microbiana inicial, monitoreo de los parámetros del ciclo de esterilización y verificación del registro de esterilización.

Una vez concedida la liberación paramétrica, las decisiones sobre aprobación o rechazo de un lote se basarán en las especificaciones aprobadas. El incumplimiento de las especificaciones para la liberación paramétrica no podrá compensarse por haber superado un ensayo de esterilidad

Referencias bibliográficas

1. USP 36. It: <71> y <1208>
2. EP. It: 2.6.1.
3. Disposición ANMAT N° 2819/04
4. PIC/S. PI 012-2 -1 July 2004
5. Nueva técnica para el control de esterilidad en la industria farmacéutica. Steritest. Millipore.
6. Ficha técnica Sistema Steritest Equinox. Millipore Corporation. Billerica. USA.
7. Guidance for Industry. FDA. *Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products*. Draft. Feb.2008.
8. Wagner C, Akers JE, Lyda JC, Meyer D, Edwards LM, Rickloff JR, et al. *Isolator Technology*. Illinois: Interpharm, 1995:354.
9. Farguson G, Holdings T. *Isolation applications in aseptic processing*. Pharmaceutical Manufacture International. 1995:181-4.
10. Friedman R. *Desing of Barrier Isolator for Aseptic processing: A GMP Perspective*. Pharmaceutical Engineering 1998; March/April:30-6.
11. *The Rules Governing Medicinal Products in the European Community*. Vol IV. Good Manufacturing Practices for Medicinal Products. Brussels; September, 1996.
12. Akers JE, Agalloco JP, Kennedy CM. *Experience in desing and use of isolator system for sterily testing*. PDA J Pharm Sci Technol 1995;49(3):140.
13. M.Sc. Tamara Figueroa Rodríguez. M.Sc. Martha Gomez Carril. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba. Febrero del 2001. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba. Febrero del 2001.
14. Agalloco J. *Oportunities and obstacles in the implementation of Barrier Technology*. PDA J Pharm Sci Technol 1995; 49(5):244.
15. Lysljord J, Haas PJ, Malgaard HL, Pflug IJ. *The potential for use of steam at atmospheric pressure to decontaminate or sterilize parenteral filling lines incorporating Isolator Technology*. PDA J Pharm Sci Technol 1995;49(5):212.
16. Callant BT. *Citotoxic Drug Containment*. Pharmaceutical Engineering 1994;Nov/Dec:56-62.
17. Browne S, Hony J, Lund R. *Use of Isolators in a Specials Manufacturing Enviroment*. European J Parenteral Sci 1999;4(2):43-7.
18. Laidlaw JL, Connor TH, Theiss JC, Anderson RW, Matney TS. *Permeability of latex and PVC to 20 antineoplastic drugs*. Am J Hosp Pharm 1984;41:2618-23.
19. Connor TH. *Permeability testing of glove materials for use with cancer chemotherapy drugs*. Oncology 1995;52:256-9.
20. Guidance for Industry. *Subdivision of Documentation in Applications for Parametric Release of Human and Veterany Drug Products Terminally Sterilized by Moist Heat Processes*. February 10 CMC.
21. Code of Federal Regulations: Title 21- Chapter I- Part 211
22. Disposición ANMAT N°2819/2004- ANEXO III
23. Farmacopea Argentina 7ma. Ed. It: 370
24. PIC/S- PI 005-2
25. EMEA-Guidance of Parametric Release

Endotoxinas bacterianas

Beatriz Giampaolo y Nélida Mondelo

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

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

1. Introducción

La fabricación de productos inyectables en la industria farmacéutica y de dispositivos médicos incluye entre sus requisitos esenciales, minimizar las fuentes de pirogénos durante la fabricación y los consecuentes riesgos de contaminación y/o impurezas o inactivarlos/removerlos según el caso ^(2,3).

En este capítulo se ofrecerá una visión general de la estructura, propiedades fisicoquímicas y biológicas de las sustancias pirogénicas más relevantes: las Endotoxinas Bacterianas (EB). Asimismo, se hará énfasis en las fuentes de contaminación, su prevención, los aspectos regulatorios y prácticos del desarrollo, validación y uso rutinario de algunas de las variantes metodológicas disponibles para su control en especialidades medicinales, ingredientes farmacéuticos activos, excipientes, y dispositivos médicos, entre otros.

2. Sustancias pirogénicas

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

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

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

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

Un pequeño número de otros pirogénos -no EB- (ácido lipoteico y peptidoglicanos) pueden provenir de bacterias Gram positivas, hongos o virus ⁽²⁾. Bajo buenas prácticas de manufactura (BPM), sin embargo, se justifica la conclusión de que la ausencia de EB “por debajo de valores límite” implica ausencia de componentes pirogénicos.

3. Endotoxinas Bacterianas: estructura, propiedades biológicas y fisicoquímicas

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

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

⁽¹⁴⁾, también dificulta su remoción durante la elaboración farmacéutica o puede afectar la capacidad de detección durante los controles por adsorberse con facilidad a distintas superficies como el vidrio, plásticos u otras ^(15,16).

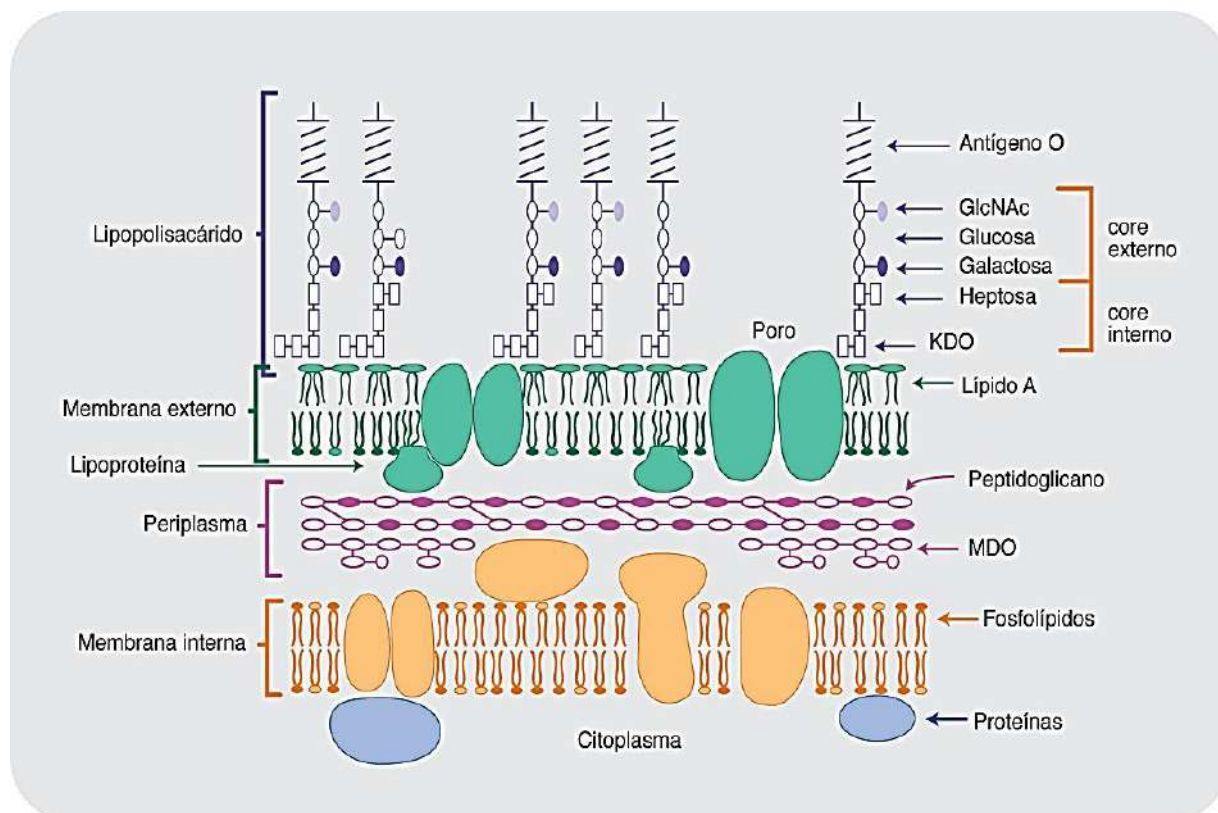


Figura 1: Representación molecular de la cubierta externa de Bacterias Gram negativas según cita (11). Óvalos y rectángulos representan residuos de azúcares. Círculos representan cabezas polares de glicerofosfolípidos (fosfatidiletanolamina en círculos llenos y fosfatidilglicerol en círculos vacíos).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

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

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

4. Despirogenización

La despirogenización puede realizarse por detoxificación o destrucción del LPS (esterilización por calor seco, tratamiento con ácidos, bases, agentes oxidantes o alquilantes, etc) o remoción de las EB, aprovechando en este segundo enfoque, sus características biomoleculares de tamaño y afinidad (destilación, ósmosis inversa, filtración, ultrafiltración, adsorción, etc) ^(19,20).

Dentro de los métodos esterilizantes convencionales el Calor seco es el método por excelencia para la destrucción del LPS y clásico cuando se trata de sustancias resistentes al calor (ej: material de vidrio). Los ciclos temperatura-tiempo deben ser validados siendo habituales 180°C / 3 horas ó, como refiere USP ⁽²¹⁾ 250°C / 30 minutos. La esterilización por Calor húmedo (121°C / 15 psi - 20 min) es inefectiva para destrucción de EB, por lo

que es importante recordar una vez más que esterilización no se acompaña con despirogenización. Se ha intentado su empleo asociado a soluciones de peróxido de hidrógeno para despirogenizar botellones de preparación o recolección de soluciones. En este caso, su eficacia será dependiente de factores tales como concentración, tiempo, temperatura y pH. Se trata de un enfoque que, como ocurre con otros métodos químicos, ofrece las dificultades propias de la validación del sistema de limpieza de residuos.

La destilación es el método por excelencia para obtención de agua calidad inyectable, dejando detrás grandes aglomerados de pirogenos durante la etapa de evaporación. Otros métodos de remoción basados en tamaño molecular, si adecuadamente mantenidos, son la Osmosis inversa (OI) y la ultrafiltración (UF). Mientras la OI se acepta como método alternativo para la obtención de Agua para inyectables- no puede emplearse para otros productos. La UF es considerada un método de alta eficiencia para purificar productos de uso parenteral distintos de agua, no sólo como parte de un proceso productivo si no también con fines analíticos como veremos más adelante ⁽²²⁾.

Los distintos métodos de filtración esterilizante empleando membranas de 0,22µm utilizados frecuentemente en la fabricación de inyectables, resultan altamente efectivos para prevenir la contaminación con EB. Por el contrario, en general, el empleo sólo de membranas de 0.45µm, no es suficiente.

Se describe un buen número de alternativas empleando membranas que exhiben diferentes capacidades de adsorción por unidad de área ^(23,24) incluyendo la incorporación de distintos agentes (ej polilisina/polietilenimina) ⁽²⁵⁾ y con distinta performance para reducir el nivel original de endotoxinas o agentes con los que ocurren fenómenos de afinidad, en columnas que permiten su regeneración posterior. Entre estos agentes inmovilizantes de EB se encuentra la histidina ⁽²⁶⁾, histamina, polimixina B ⁽²⁷⁾, la proteína aumentadora de la permeabilidad-bactericida BP ^(28,29), heparina, lisado reactivo ⁽³⁰⁾. En estos casos, se aprovecha de las propiedades hidrofóbicas y la carga negativa de las EB (a diferencia de la UF, por ej, donde las endotoxinas se excluyen por tamaño molecular). Otros enfoques también han considerado centrifugación en gradientes de sacarosa y separación de fases con Triton X-114 o cromatografía de intercambio aniónico ⁽³¹⁾. Estas últimas opciones, podrían beneficiar a áreas más específicas y asociadas a procesos productivos de alta complejidad o para productos lábiles (biotecnológicos por ej.) ⁽³¹⁾ y de investigación y desarrollo. Tal es el caso de tubos para microcentrifuga conteniendo partículas de resina acopladas a una proteína neutralizante de endotoxinas, para volúmenes pequeños de 1 a 2 ml y con alta capacidad de retención de endotoxinas. La Radiación γ , utilizada para esterilización de jeringas y dispositivos médicos críticos - aquellos con contacto directo o indirecto con el sistema cardiovascular- y algunas materias primas biológicas como enzimas, presenta índices importantes de despirogenización, aunque es muy dificultoso implementar la validación del proceso. En nuestra experiencia y la de otros autores ⁽³²⁾, dosis usuales de esterilización con radiación γ de 25 - 35 kGy pueden reducir los niveles iniciales de EB en viales con endotoxina liofilizada hasta un porcentaje del 30 %. En otros casos, por ejemplo para implantes de pieles congeladas, fue necesario aumentar las dosis de radiación usuales (a 50 kGy), afectando la integridad de los mismos ^(33,34,35).

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

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

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

5. Endotoxinas Bacterianas: Fuentes de contaminación y su prevención

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

En Argentina, se cuenta con amplia normativa aplicable en la elaboración de formas farmacéuticas inyectables, dispositivos médicos críticos y otras preparaciones de uso hospitalario como nutricionales, oncológicas, etc, en las que se encuentran los requerimientos de calidad de ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) y su elaboración, excipientes, productos biológicos/biotecnológicos incluyendo hemoderivados, materiales de envases, instalaciones, equipamiento y procesos ^(38,39, 40)

Dentro de los insumos, el agua es considerada fundamental en la elaboración de productos inyectables. Puede estar presente como excipiente o usarse para la reconstitución de productos farmacéuticos, emplearse para la síntesis de ingredientes activos, durante la producción del producto terminado o como agente de limpieza de recipientes, equipos y envases primarios ⁽⁴¹⁾. Sus sistemas de producción, almacenamiento y distribución deben ser diseñados acorde a lo codificado en Ph Eur ⁽⁴²⁾ y USP ⁽⁴³⁾ para Agua Calidad Inyectable y validados, de forma de prevenir la contaminación microbiana, disminuir los riesgos de formación de bio-películas propios de las bacterias Gram negativas, y en consecuencia los riesgos de generar una fuente de EB asociadas a microorganismos muertos o libres en el medio ⁽⁴⁴⁾. La circulación constante a una temperatura superior a 70°C o no más de 4°C, es esencial como método de preservación microbiológica y de formación de EB.

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

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

La búsqueda de endotoxinas estará muy ligada a aquellos procesos en los que no hay un paso de despirogenización como parte de los mismos. Las materias primas deben incluir requisitos de calidad microbiológica incluyendo EB. El flujo sanitario de ingresos de estos insumos, envases, recipientes de productos a granel, equipos y cualquier otro artículo necesario en las áreas limpias clasificadas donde se efectúen trabajos asépticos, debe estar suficientemente controlado. Si en cambio, el proceso involucra remoción-lavado de tapones-/inactivación de endotoxinas-despirogenización por calor seco de equipos, esta etapa debe ser validada. Mientras tanto, asegurar el secado de cualquier equipo luego de su limpieza, excepto se proceda en forma inmediata a su esterilización/ despirogenización es imperativo ⁽³⁾.

Se requiere un programa efectivo de monitoreo microbiológico para que el proceso de llenado aséptico se encuentre bajo control. Los principios básicos para validación y certificación de procesos esterilizantes y asépticos se encuentran bien descriptos en USP ⁽⁴⁴⁾.

En el caso de dispositivos médicos, cada fabricante debería evaluar el potencial de pirogenicidad de cada dispositivo. Por ejemplo, los factores críticos pueden incluir -aunque no están limitados por- procesos húmedos en los cuales agua y otros materiales acuosos se utilizan como parte del proceso de fabricación (enjuague, lavados, etc) comparativamente con el menor riesgo de fabricación en seco a altas temperaturas (plásticos extrudados con calor) o ensamble de materiales (líneas de ensamblado de kits) en los que el proceso entero puede hacerse sin agua o procesos acuosos ⁽³⁾. Ingredientes tales como anticoagulantes para bolsas de recolección de sangres, también deberán ser ensayados con iguales requerimientos de una droga o fármaco.

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

6. Ensayo de Endotoxinas Bacterianas

6.1. Surgimiento y fundamentos

Fueron Levin y Bang quienes, en 1964, identificaron que la coagulación intravascular diseminada y muerte en el cangrejo herradura americano (*Limulus polyphemus*)⁽⁴⁵⁾ era debido a la presencia de endotoxinas provenientes de bacterias Gram negativas. Accidentalmente este hecho había sido descubierto 50 años antes en un Centro de Investigación Marina de EEUU.

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

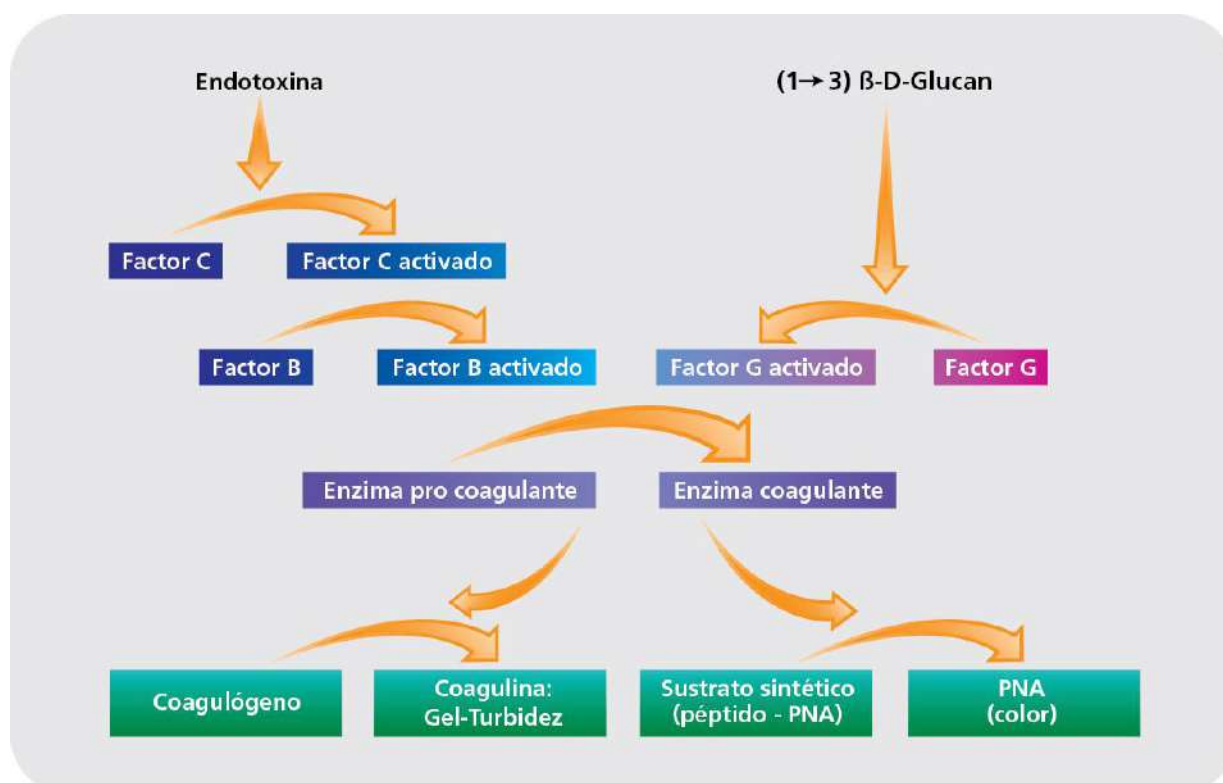


Figura 2: Representación esquemática de la cascada enzimática que responde a la activación por EB- base de los ensayos de detección disponibles- y por (1,3)-β-D- glucanos.

En 1969, Cooper y colaboradores decidieron aplicar la activación de la cascada enzimática de defensa de los cangrejos con respuesta de gelificación al diseño de un bioensayo muy sensible para la detección y cuantificación de endotoxinas popularmente conocido como ensayo del Lisado de amebocitos de *Limulus* (ensayo LAL), ya que en este lisado, obtenido a partir de hemolinfa anticoagulada, se encuentran los factores necesarios (factores B, C y la enzima procoagulante, todos con actividad serin-proteasa) para, en respuesta a la presencia de endotoxinas, formar un coágulo gelatinoso (pasaje de coagulógeno a coagulina insoluble)⁽⁴⁶⁾.

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

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

Varios estudios entre la industria farmacéutica y de dispositivos médicos y las agencias regulatorias han sido claves en la aceptación del ensayo de EB como reemplazo del histórico método de evaluación de pirogenos en conejos como ensayo de liberación de producto terminado. A modo de referencia pueden

citarse el de la Health Industry Manufacturers Association (HIMA) y la FDA ⁽⁴⁷⁾ estableciendo la dosis umbral piretógica a partir de una endotoxina purificada de Difco. Para ese entonces, aún no se contaba con un estándar apropiado de referencia que permitiera comparación precisa de resultados entre laboratorios.

Gran impacto regulatorio generó el estudio de Mascoli y Weary ⁽⁴⁸⁾ al confirmar, tras la comparación de resultados de aproximadamente 150.000 ensayos de EB *in vitro* (EEB) y 28.000 ensayos de piretógenos *in vivo* en dispositivos médicos y soluciones parenterales, que los piretógenos hallados siempre fueron de origen bacteriano, que en una mayoría su presencia fue inadvertida en el ensayo *in vivo*, mientras que, por otro lado, no se detectó ocurrencia inexplicable de falsos negativos en el ensayo *in vitro*. Esto llevó a la FDA a aprobar el ensayo, y en el año 1980 aparece en USP XX el primer capítulo informativo sobre el EEB seguido al poco tiempo, por el lineamiento de la FDA relacionado con la validación del método, para productos terminados de uso parenteral, dispositivos médicos y productos biológicos⁽⁴⁹⁾. Por su lado, la Comisión Europea, a comienzos de los 80, emprendió estudios propios y ya en 1985 recomendó la implementación del EEB a la Industria y Organismos de salud de los estados miembros.

Durante la década del 80, grupos de investigadores japoneses ^(50,51) se dedicaron ampliamente a estudiar el mecanismo de gelificación del LAL y también desarrollaron el método cromogénico. Describieron a la enzima coagulante como un prototipo de las serin-proteasas, que participan en la coagulación de la sangre humana y los cambios estructurales que produce sobre el coagulógeno, como una proteólisis limitada a nivel del grupo amino terminal con clivaje (similar a lo que ocurre con la trombina en la coagulación humana) en secuencias Arg-Gly y Arg-Thr, con posterior conformación del gel de coagulina desde el coagulógeno. El método cromogénico para el EEB se desarrolló fundamentado en la hidrólisis de sustratos específicos que poseen, en grupo carboxi terminal, una secuencia Gly-Arg acoplada al cromóforo p-nitroanilina (pNA), que, cuando se libera como paso final de la activación de la cascada enzimática, puede ser cuantificado por espectrofotometría ⁽⁵²⁾

Las primeras monografías que reconocieron oficialmente al EEB fueron las correspondientes a aguas para inyección y para irrigación y las de varios radiofármacos. Paulatinamente, en los siguientes años, el ensayo de piretógenos en conejos fue desplazado como método de control en la gran mayoría de los productos en los que aplicaba, siendo tal vez los antineoplásicos los siguientes productos cuyas monografías reemplazaron el ensayo en conejos por el EEB, reemplazo al que adherimos rápidamente en nuestro país ⁽⁵³⁾. En revisiones de la USP XXIII, efectivas a partir del año 1993, el EEB pasó a ser compendial para liberación de la mayoría de los productos inyectables, reemplazando al ensayo de piretógenos en conejos. En este capítulo sólo se describía al método de gel en tubo, y mencionaba como alternativas emergentes, si adecuadamente validadas, a los métodos cromogénico y turbidimétrico (ver ítem 6.2).

En los comienzos de los 90, también se publicaron listas con límites de endotoxinas para un número importante de especialidades medicinales ⁽⁵⁴⁾. Hasta ese momento esos límites se calculaban en base a dosis en ensayo de piretógenos y generalmente había diferencias con las estimadas por los fabricantes.

En el año 2001, se adopta un EEB armonizado por las regiones vinculadas a la ICH. ICH Q4B Annex 14 ⁽⁵⁵⁾ indica que los procedimientos analíticos descriptos en farmacopeas oficiales (Ph Eur 2.6.14; JP 4.1 y USP <85>) podrán usarse en forma intercambiable tomando en consideración el empleo de estándares de endotoxina calibrados frente al Estándar Internacional de la OMS, cualquiera sea la metodología empleada y manteniendo como ensayo de referencia, en caso de disputa, al ensayo de gel en tubo, que describiremos más adelante en este capítulo (lo cual no debe interpretarse como el método al cual puede recurrirse para liberar un producto con resultado fuera de especificaciones bajo otra metodología habitual validada).

Recientemente en la 6ta edición de la Farmacopea Europea, se ha propuesto al EEB como opción de control válida para ciertos hemoderivados bajo determinadas circunstancias ⁽⁵⁶⁾

Al día de hoy, es reconocida la alta especificidad del EEB tal como se describe en las distintas farmacopeas, habiéndose reconocido como activadores no específicos a (1,3)- β -D-glucanos-polímeros de moléculas de glucosa- y permitiendo el uso de reactivos LAL que no reaccionen con ellos ^(21,57).

En Argentina, la Farmacopea Argentina incluyó monografía general en su revisión actualizada del año

6.2. Metodologías de Ensayo de Endotoxinas Bacterianas

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

Los métodos corrientemente empleados son

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

Las Farmacopeas ^(21, 57, 58) describen detalladamente los distintos pasos para la ejecución de un buen EEB, por lo que consideramos imprescindible su lectura e innecesaria una reiteración de los mismos. Cualquiera sea la técnica seleccionada, deberán cumplirse los requerimientos de confirmación de sensibilidad de los reactivos/parámetros de curva de calibración y “no interferencia” (inhibición/activación).

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

Como ya anticipáramos, las Farmacopeas y las ICH siguen considerando al método de gel en tubo como método de referencia en caso de dudas y disputas.

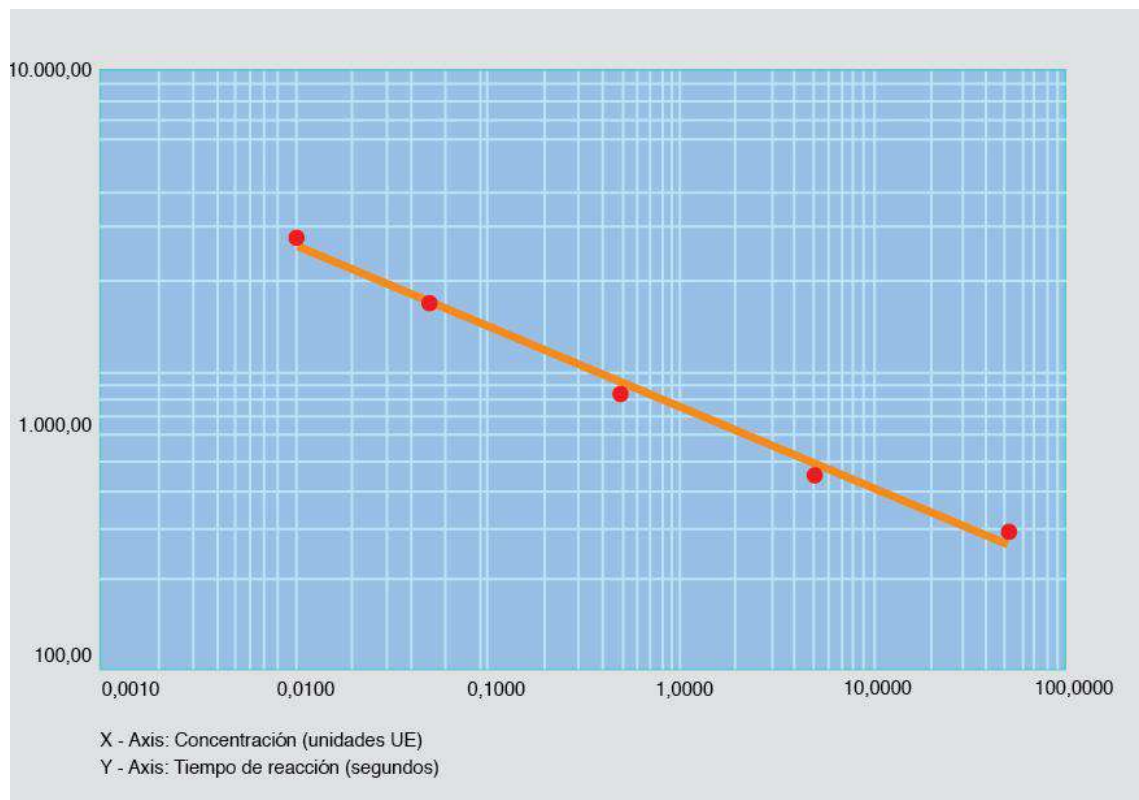
Técnica de gel en tubo basada en la formación del coágulo gelatinoso fue la primera técnica incluida en Farmacopeas. La ventaja de este método es su simplicidad, ya que la decisión de aprobar o rechazar el producto examinado se basa, en la forma de Ensayo Límite, en la ausencia o presencia de gelificación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

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

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

En los métodos de punto final, la cuantificación requiere una curva de calibración generada con valores de densidad óptica al finalizar un período de incubación con distintas concentraciones de Endotoxina Standard. La reacción no se detiene y por razones prácticas, esta alternativa no es conveniente y, hasta donde sabemos, no se encuentra disponible comercialmente ⁽⁵⁹⁾. En el ET cinético, la curva de calibración (Figura 3) incluirá en el eje de ordenadas valores transformados -en logaritmos- de tiempos de reacción para alcanzar un nivel predeterminado de turbidez (en inglés “onset time”, en segundos hasta un nivel de, por ej. 0.05 unidades de absorbancia) y, en el eje de las abscisas, el logaritmo de concentraciones de endotoxina estándar.

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



6.3. Aspectos prácticos

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

6.3.1. El Lisado Reactivo

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

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

En ensayos fotométricos, el valor absoluto del coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración debe ser mayor o igual a 0.980. La menor concentración de esa curva válida, será el valor a considerar en cálculos de contenido de endotoxinas en una muestra.

6.3.2. La Endotoxina Estándar

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

Hacia mitad de la década del 90, y reconociendo el uso creciente de método fotométricos ^(60,61), el NIBSC establece el IS-2 ⁽⁶²⁾, actualmente vigente, a partir de la misma preparación purificada de LPS. Se le asigna una potencia de 10.000 UI/ampolla, en base a resultados de 24 laboratorios que emplearon sus técnicas y reactivos habituales y un lisado reactivo común a todos. Vale recordar que una UI se define como la actividad específica de una masa definida del Patrón Internacional vigente.

La endotoxina de referencia de la FDA (actualmente EC-6), el lote G de la USP (USP RSE), el lote vigente de la farmacopea europea (BRP 3) y el IS-2 son sub-lotes de la misma preparación de endotoxinas. Por esta razón una unidad internacional es equivalente a una unidad de endotoxinas (UE) tal como figura en USP y en JP. Sólo la Ph Eur refiere a 1 UI en su monografía ^(3, 62, 63).

Para los ensayos de rutina, se acepta el empleo de estándares secundarios o de trabajo ^(64, 65). En nuestra FNA actualmente vigente, para referirse a ellos, se emplean las siglas CSE del nombre en inglés *Control Standard Endotoxin* tal como figura en el más reciente lineamiento de FDA sobre el tema ⁽⁶⁵⁾ y como refería la USP en versiones originales antes de la armonización con JP/Ph Eur. En general, estos estándares -secundarios para nuestra legislación-son provistos por los mismos fabricantes de lisados reactivos, quienes deberán establecer fehacientemente su potencia relativa a un estándar de referencia internacional (o equivalente, tal como es el caso del lote EC-6 de la FDA). El Certificado de análisis adjunto refiere a una **específica** combinación LAL/CSE y certifica la relación de potencias RSE/CSE, instrucciones de rehidratación y almacenamiento. Alternativamente, aunque no es habitual, podrá estandarizarse en el laboratorio. De hacerlo, - tiene cierta laboriosidad-, recomendamos recurrir al lineamiento de la FDA del año 1987, donde se describen el procedimiento y los cálculos ^(49,67,68,69)

6.3.3. El Agua Reactivo

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

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

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

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

No descartar la presencia de posibles interferentes, no siempre de fácil reconocimiento. Inhibidores tales como aluminio, cobre, hierro y activadores tales como calcio y magnesio han sido descriptos en distintas publicaciones. Si bien es de difícil explicación, pero tal vez está relacionada a la diferencia composición de estándares de endotoxinas, el impacto de estos inhibidores puede diferir según la marca comercial y la presencia de "carriers de agua" tales como albúmina u otros, facilitando la dispersión aún en presencia de ellos ^(67,68,69)

6.3.4. Los Equipos e Instrumentos

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

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

Las endotoxinas pueden adsorberse a la superficie de los tubos o pipetas de ciertos tipos de plástico o de vidrio. También se han descripto interferencias debido a la liberación de sustancias de los materiales plásticos (microplacas, por ej) ^(69,70). Por consiguiente, los materiales utilizados en el ensayo deben controlarse. Como la composición de los tubos o pipetas puede variar ligeramente de un lote a otro, se recomienda al analista repetir los ensayos al comenzar un nuevo lote de materiales o alternativamente usar datos históricos (ej tendencia de control negativo)/certificados de fabricantes ⁽⁷²⁾.

6.4. Establecimiento de Límites de Endotoxinas

El límite de endotoxinas define la máxima concentración permitida en el artículo ensayado. Ese límite puede obtenerse de monografías farmacopeicas. Cuando éstas no existen, pueden calcularse con la fórmula K/M que apareciera en el primer lineamiento borrador de la FDA en el año 1983 y que se explica y discute en distintas publicaciones ^(72, 73) donde:

K es un valor fijo igual a 5 UE/kg, que representa aproximadamente la dosis piretogénica umbral en conejos y humanos, según varios estudios empleando una endotoxina estándar de referencia de *E coli* 055:B5. Para drogas de administración intratecal, el límite se reduce a 0.2 UE/kg, basándose en literatura científica que indica que, por esta vía, son menores las dosis de endotoxinas capaces de producir una respuesta febril ⁽⁷⁵⁾, y

M es la máxima dosis humana expresada por kg de peso en bolo o al final de la vida útil para radiofármacos), tomando 70 kg de peso como referencia o la dosis pediátrica/kg si ésta fuera superior (para la JP, el valor promedio será de 60 kg ⁽⁷⁶⁾). M puede expresarse en diferentes unidades según se haya expresado la dosis humana (mg, mEq, Unidad, ml) y puede extraerse de prospectos o en ocasiones, de bibliografía (máximas dosis en estudios clínicos de investigación).

M puede tomar la forma: *dosis máxima recomendada/m²/hora/1.80 m²/70 kg*, cuando se trate de formulaciones (habitualmente oncológicas) cuya dosis se exprese por metro cuadrado de superficie corporal. . Recientemente, para estas formulaciones se ha establecido un valor de 2.5 UE/kg para el valor de K.

Para radiofármacos y según USP, los límites se calcularán mediante las fórmulas 175/V o 14/V, para vías parenterales excepto intratecal o intratecal respectivamente, siendo V la dosis máxima recomendada por ml. Los límites según Ph Eur son equivalentes a USP aún cuando difiere la forma en que se presenta el cálculo.

En el caso de los dispositivos médicos, y para compensar la relativa ineficiencia ⁽⁷⁷⁾ en el método de preparación de eluatos por lavado o extracción de las EB que pudieran contaminarlos, la FDA estableció un valor límite de 20 UE/unidad, comparativamente más exigente considerando las 350 UE (5 UE/kg x 70 kg) admisibles para un fármaco. Entonces, la fórmula que aplica en estos casos es: K.N/V, siendo K: 20 UE/unidad, N: número de unidades ensayadas y V: volumen total de solución de extracción/enjuague.

Los productores de IFAs o excipientes se encuentran en la necesidad de establecer límites cuando éstos serán empleados en la formulación de productos inyectables. Éstos se encuentran en monografías farmacopeicas, a veces por ser de origen vegetal o animal, por razones de buenas prácticas y exigencias de fabricantes que desean tener bajo control este aspecto, antes de iniciar el proceso productivo. Tomando en cuenta el resto de los componentes de la formulación que los incluya, se han desarrollado estrategias en

el caso de múltiples ingredientes, de forma de acomodar la contribución de los mismos en el producto final de forma que este no contenga más de los 350 UE permitidas para un adulto de 70 kg, bien descritas por algunos autores ^(2, 78)

A modo de ejemplo, consideremos el producto ABC, siendo B y C ingredientes inactivos con límites establecidos (1 y 0.5 UE/mg respectivamente) y A el ingrediente activo no codificado. La composición unitaria (que a su vez es la máxima dosis en este ejemplo) es: A: 100 mg; B: 100 mg y C: 300 mg

Se plantea la siguiente fórmula para el cálculo del límite aceptable de A en ABC:

$$350 - [100 \times 1] - (300 \times 0.5) / 100$$

lo cual arroja un valor de 1 UE/mg aceptable para A en esta formulación y permite asegurar que el producto final no excederá el límite permitido.

Todos los ingredientes de la formulación deben ser considerados, excepto tal vez alguno para el cual exista un racional claro para su exclusión. Por ej, cresol es un antimicrobiano obtenido por sulfonación u oxidación de tolueno, fabricado con materiales despirogenantes, a temperaturas despirogenantes y resulta improbable su contaminación post-fabricación sin agua que permita el crecimiento bacteriano.

En caso de ser necesario determinar límites para 2 o más componentes de una formulación, podrán establecerse en forma proporcional a su peso en la formulación o bien, proponer un límite aceptable para cada uno de ellos y estimar según el ejemplo anterior el restante.

Consideremos otra formulación conteniendo ABC, con 10 mg de A; 30 mg de B y 5mg de C. Si ninguno de esos componentes tiene límite codificado o propuesto y el paciente recibirá 1 dosis como máximo por hora, el límite para cada componente será:

$$A: (10 \times 350) / 45$$

$$B: (30 \times 350) / 45$$

$$C: (5 \times 350) / 45$$

Si el componente cuyo límite se establece mediante alguna de las formas anteriores se encuentra en 2 o más formulaciones (ej: un excipiente), el valor más exigente será el que se utilizará para establecer el límite de EB.

Por otro lado, convenientemente el laboratorio debería establecer límites de alerta para producto terminado y límites inferiores para graneles (solución para liofilizar por ej.) o activos farmacéuticos (codificados o no) de forma de contar con un cierto margen de seguridad frente al valor máximo tolerado del producto terminado al que darán origen.

6.5. Máxima dilución válida

La dilución con agua reactivo u otro diluyente apropiado, como se discutirá más adelante, es la práctica aceptable más simple para superar la presencia de “interferencias” que pudieran afectar Sin embargo, la dilución de interferentes, como es obvio, también “diluye la contaminación con EB” eventualmente presente. Por esa razón, se establece un límite (Máxima Dilución Válida -MDV-), que dependerá del límite de Endotoxinas aceptable, la concentración inicial del “producto” en la solución y la sensibilidad del ensayo empleado.

$$\text{Límite de endotoxinas (EU/mg o UI o ml)} \times \text{Concentración de la solución de la muestra (mg o UI o ml/ml)}$$

$$\lambda \text{ (EU/ml)}$$

A la hora de calcular el valor de MDV y durante el proceso de validación, considerar el Límite de Endotoxina de alerta si los procedimientos internos del laboratorio han indicado su establecimiento.

Un término que, aún cuando se ha excluido en documentos armonizados, sigue siendo citado en numerosas publicaciones y libros, y que se “autodefine” es la MCV (mínima concentración válida). Corresponde a la concentración en la MDV y no necesita, a diferencia de la MDV, aclararse la concentración de solución de inicio para su estimación.

6.6. Prueba preliminar de interferencias (inhibición/activación)

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

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

En la práctica, se incluyen 2 series de diluciones en paralelo de un lote del artículo en estudio: una de ellas contendrá cantidades conocidas de endotoxinas, equivalente al doble de la sensibilidad del lisado-reactivo (tubos “spike” o diluciones “spiked”, según el término en inglés muy usado en nuestro medio). Podrá iniciarse la serie de diluciones a partir de una solución concentrada si se trata de un activo/excipientes sólido (alejada de la MDV) o de la concentración original del producto (inyectable o solución) o de la concentración inicial tras reconstitución según indicaciones al paciente (inyectable liofilizado) u otro enfoque, según el caso y extenderse hasta la MDV.

En las técnicas de gel en tubo, se utiliza un criterio simple: se acepta como “no interferente” a una dilución de un producto cuando se comprueba que la sensibilidad del lisado en presencia del mismo es como mínimo 0,5 veces y como máximo 2 veces la sensibilidad del lisado reactivo cuando éste se encuentra solo-rigurosamente, solamente acompañado con el diluyente del producto-. O sea, la sensibilidad del lisado no difiere significativamente de su sensibilidad en ausencia del producto. En esta técnica, en la que sólo podremos superar las interferencias negativas, la muestra del producto no debe contener endotoxinas detectables. Si no fuera así, se presenta un inconveniente, mayor si se tratara de un producto nuevo y difícilmente diferenciable de un fenómeno de “activación”.

Los procedimientos de eliminación de factores de interferencia no deben aumentar ni disminuir (por ejemplo, por adsorción) la cantidad de EB en el producto a examinar. El modo correcto de verificar que esta condición se cumple es aplicar los procedimientos a una muestra a la que se ha añadido una cantidad conocida de EB y, tras el procedimiento, determinar su recuperación.

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

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

6.6.1. Posibles causas de interferencias

Si hubiera evidencias de interferencias, no podrá continuarse con la validación definitiva antes de plantearse cual/cuales pueden ser las posibles causas. Cooper, entre otros, señala principalmente las siguientes ^(79,80)

- *pH de la mezcla muestra/ lisado reactivo en un rango subóptimo.* Por tratarse de una serie de reacciones enzimáticas, éste es un punto crítico y, según Cooper y nuestra experiencia, el problema más común ⁽⁸¹⁾.
- *concentraciones inadecuadas de cationes.* Los cationes divalentes son comúnmente parte de formulaciones de lisados y tanto su depleción como las altas concentraciones tienen impacto ⁽⁸¹⁾ (ejemplo: efecto activador de los gluconatos de calcio ⁽⁸³⁾ corroborado en los primeros estudios de compatibilidad del Servicio de Ensayos de Pureza del Departamento de Productos Biológicos del

INAME ^(84,85).

- *alta osmolaridad*. En general se puede afirmar que altas concentraciones de sales y azúcares podrán resultar inhibitorias en cualquiera de los EEB (ejemplo dextrosa al 70 %, cloruro de sodio al 5 %).
- *metales pesados*. Pueden provenir de macromoléculas de uso terapéutico (zinc, cobre, hierro) o compuestos organometálicos (cisplatino) o ser contaminantes de distintos orígenes (ejemplo: extraíbles de contenedores o dispositivos médicos) u otros (merthiolate) y presentar una respuesta inhibitoria.
- *detergentes*. Pueden afectar el estado de polimerización de EB (y su respuesta frente al ensayo LAL, por agregación o adsorción de “spikes” en controles positivos, por ejemplo)
- *proteínas/inhibidores de proteasas*. Las proteínas pueden unir a las EB con resultados impredecibles o sus preparaciones contener inhibidores comunes que inhiben la activación del LAL por endotoxinas. En nuestra experiencia ⁽⁸⁶⁾, factores de coagulación VIII y IX presentaron activaciones inespecíficas sobre la enzima coagulante. Otros autores ⁽⁸⁶⁾ han descrito similares reacciones con éstos y otros zimógenos plasmáticos humanos tales como fibrinógeno, protrombina, plasminógeno y precalicreína
- *activación no específica de LAL*. Los reactivos convencionales generalmente contienen Factor G, que es un pro-proteasa. El Factor G es activado por (1,3)-β-D-glucanos u otras sustancias no piretogénicas, incluyendo componentes de hemodializadores de fibra hueca (Cuprophane) y materiales celulósicos de ciertos filtros usados en la industria farmoquímica, más que en fabricación de productos farmacéuticos.. Se han reportado también estas activaciones inespecíficas con extractos de levaduras y hongos, algunos biológicos, carboximetilcelulosa y algodón. El factor G activado directamente activa la enzima procoagulante y causa una reacción positiva en el EEB (ver Figura 2): en el ensayo de gel en tubo, se manifiesta como reacción positiva aún no conteniendo EB contaminantes mientras que en ensayos fotométricos, la recuperación del spike podrá superar el 200 % permitido ^(88,89)

6.6.2. Búsqueda de soluciones para superar interferencias

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

- *Está frente a un problema de pH fuera de rango?*
 - Podrá probar con dilución de la muestra con agua, un buffer Tris o la adición de ácido clorhídrico/hidróxido de sodio diluido para neutralizar el pH de la muestra (si el efecto “buffer” de los lisados reactivos no fuera suficiente para llevar la mezcla lisado/ muestra al pH óptimo para el EEB).
- *Es un producto con capacidad quelante?* (EDTA, bisfosfonatos, citratos, anticoagulantes para bolsas de sangre tales como ACD y CFD Adenina ⁽⁸⁴⁾)
 - Podrá superarse, como último recurso, con diluciones o adición de cationes divalentes (ej MgCl₂ 50 mM) para contrarrestar la acción quelante de algunos productos, si la dilución o el cambio de fabricante de lisado reactivo no es suficiente ⁽⁹⁰⁾
- *Posee actividad enzimática (tripsina o proteasas de serina)?* (por ej. las heparinas cálcica y sódica poseen actividad antitrombina, con efecto equivalente a la enzima coagulante)
 - Las heparinas, por ejemplo, inhiben fuertemente etapas de progelificación-gelificación pero grandes diluciones permitieron superar interferencias en el Ensayo de gel en tubo ⁽⁹¹⁾
 - En Albúmina humana, que puede encontrarse en una formulación como excipiente, resultados positivos podrían interpretarse como indicadores de cierta presencia de EB. Sin embargo, podría tratarse de un “falso positivo” en concentraciones cercanas a las de uso terapéutico y ser fácilmente superables con lisado reactivo de mayor sensibilidad que permita mayores

diluciones de la muestra ⁽⁹²⁾.

- Desnaturalización proteica (ejemplo 70°C-10 minutos), previo a la dilución, si la preparación contiene una enzima que interfiera o mimetice la acción de las EB en la cascada enzimática del lisado reactivo.
- *Puede contener un material celulósico?* (LAL RM: material reactivo en el EEB) .Se reconocen a los glucanos como principales responsables por su naturaleza ubicua en IFAs o excipientes, así como su actividad inmunomoduladora. Sin embargo, las concentraciones que típicamente pueden encontrarse en preparaciones farmacéuticas no han mostrado efectos clínicos indeseables ⁽⁷⁹⁾. La presencia de glucanos en trazas es reconocida como fuente de resultados atípicos y de difícil interpretación, variables en resultados, entre diferentes lotes de reactivo de un mismo proveedor o con diferentes marcas comerciales.
- Podrán emplearse lisados a los que se haya removido el factor G o buffers para reconstitución de lisado que permiten aumentar la especificidad del EEB aún en presencia de glucanos (ej buffers con CM curdlan que es un β glucano y que, en altas concentraciones, inhibe la activación del Factor G por la pequeñas cantidades de glucano que pudieran estar presentes)⁽⁸⁹⁾.
- *Sospecha de cambios en estado de agregación?* (ej en algunas soluciones de sales que producen agregación de la endotoxina standard y pobre recuperación de los spikes)
 - Podrá incluir agentes dispersantes comercialmente disponibles junto a dilución para superar la elevada fuerza iónica
- *Cuál es el Peso Molecular del compuesto?* Si hubiera endotoxina endógena o interferencias y debieran ser removidas por afinidad o filtración, el PM determinará el camino a seguir.
 - La ultrafiltración a través de membranas filtrantes asimétricas de triacetato de celulosa u otras (con “cut off” apropiado de 20.000 por ejemplo) o por métodos de afinidad han demostrado ser adecuadas en la mayoría de los casos, cuando la dilución no ha sido suficiente. Con algunos agentes (alcoholes, etc) puede ocurrir modificación de las enzimas del lisado y si no puede optarse por dilución adicional habrá que pensar en algún proceso más complejo y difícil de validar para eliminar el “agente ofensivo” (ultrafiltración por ej bajo la premisa que en el ultrafiltrado se eliminan las interferencias mientras que, en el filtro, por su mayor PM permanecen las EB y entonces, podrán ser cuantificadas).

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

6.7. Prueba definitiva de interferencias (inhibición/ activación)

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

En relación a este punto, Cooper sugiere, razonablemente, que, para la **prueba definitiva de interferencias**, la concentración compatible seleccionada no debería ser la primera concentración que permita la recuperación de $2 \times \lambda$ en técnica de gelificación durante la pre-validación. Si los resultados lo permiten, la segunda o tercera dilución no interferente podrá asegurarnos que nos acercamos a recuperaciones más cercanas al 100 %. De igual modo, en técnicas fotométricas, convendrá seleccionar aquella que resulte en una recuperación más centrada respecto al rango de aceptación (es decir alrededor del 100 %). También Cooper señala que es conveniente dejar bien establecido que no será necesario

chequear el pH de la mezcla lisado-reactivo lote a lote, si este aspecto ha sido adecuadamente evaluado durante las etapas de validación ^(93,94).

6.8. Ensayo de rutina

Como ya se indicara en otros puntos, todos los detalles (planes de muestreo, preparación de soluciones, extracción, manejo de duplicados y réplicas, etc.), deberán encontrarse claramente descriptos en procedimientos operativos. (POEs)

6.8.1. Muestra

Cuando se trate de producto terminado, es razonable sugerir ^(49,65) que la técnica de muestreo y el número de unidades a ensayar estén basados en un proceso de fabricación controlado y en cumplimiento de requerimientos de sistemas de calidad, el tamaño de lote y que refleje el método de muestreo empleado durante la validación. Como mínimo se espera el ensayo sobre 3 unidades representativas del principio, medio y final del lote ⁽⁶⁵⁾.

Las unidades (contenido de jeringas prellenadas, frascos-ampolla, ampollas, etc) pueden ensayarse en forma individual o en mezcla de "n" unidades. Es razonable asumir que, puede existir distribución inhomogénea de endotoxinas en las unidades que componen la muestra en ensayo y, si este fuera el caso, la mezcla de las mismas puede generar una dilución del contenido inicial de endotoxinas en alguna de las unidades y en consecuencia producir un "falso" cumplimiento. Tiene sentido, en este caso, disminuir a $1/n$ el valor de endotoxinas límite ⁽²⁾. En esta misma línea de pensamiento, sólo recientemente la FDA ha oficializado este enfoque-ya aplicado en nuestro medio por algunos laboratorios- admitiendo la mezcla de no más de 3 unidades, cuando se trate de soluciones acuosas ⁽⁶⁵⁾ y señalando ciertas precauciones para la mezcla. Admite, de esta forma, la estimación de una MDV ajustada con un valor límite de endotoxinas que considere la mezcla efectuada.

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

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

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

6.8.2. Soluciones

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

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

- **Solución de la muestra en estudio**

De igual forma, la solución de la muestra en la concentración de ensayo, debería analizarse tras su preparación u obtención (por ej en el caso de aguas). Tener *in mente* la adecuabilidad del contenedor y el período de almacenamiento de forma de evitar adsorciones o inactivaciones que puedan resultar en "falsos negativos" ⁽⁸⁰⁾.

- **Otras:**

Otras soluciones empleadas para ajuste de pH de muestra (hidróxido de sodio 0.1 m/l o ácido clorhídrico 0.1 m/l, buffer Tris), buffers bloqueantes de glucano, solución de cloruro de magnesio u otras se encontrarán disponibles comercialmente o deberán calificarse para asegurar que no posean endotoxinas detectables.

6.8.3. Ensayo

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

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

6.9. Interpretación de los resultados

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

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

6.10. Aplicaciones

Numerosas monografías o capítulos generales farmacopeicos refieren al requerimiento del EEB como parte de liberación de distintos productos (40, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101). Por ejemplo:

- Especialidades medicinales para inyección (soluciones, polvos, liofilizados, etc.), de origen sintético, semisintético o natural.
- Agua para inyectables, colirios y para productos que se administran por inhalación.
- Materias primas "calidad inyectable" (dextrosa, manitol, dextranos, antibióticos, aminoácidos, etc.)
- Insumos como envases plásticos, cierres elastoméricos y jeringas asociados a productos de uso parenteral. La prueba debe realizarse sobre eluatos preparados por extracción o lavado de una muestra representativa de los envases, tapones, jeringas, etc. en volúmenes de agua libre de EB.
- Materiales relacionados con hemodiálisis (además del agua para dilución, concentrados y/o soluciones)
- Materias primas biológicas naturales y obtenidas por tecnología ADN recombinante (hemoderivados, hormonas, factores estimulantes de la hematopoyesis, anticuerpos monoclonales, etc)
- Excipientes calidad controlada (albúmina humana, sorbitol, polisorbatos, manitol, etc).
- Dispositivos médicos que tengan contacto directo o indirecto con el sistema cardiovascular, linfático, fluido cerebroespinal, sets para administración de soluciones, sets de transferencia, catéteres, implantes o dispositivos de infusión o productos oftálmicos para uso intraocular

- Controles de proceso (productivos o pro-analíticos): validación de procesos de filtración y despirogenización, control de insumos y columnas de purificación, control de medios de cultivo y otros insumos para ensayos biológicos *in vitro* con cultivos celulares.
- Otros: extensivo a otras actividades donde se aplican regulaciones interdisciplinarias de elaboración de medicamentos y dispositivos médicos como elaboraciones hospitalarias nutricionales, oncológicas. En todos estos casos, es recomendable la exigencia de calidad certificada en todos los insumos tanto de las especialidades medicinales, materias primas y dispositivos médicos, así como también el seguimiento de las BPM.

Aplicaciones especiales

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

Es importante considerar que estas especialidades medicinales pueden contener altas concentraciones de albúmina humana como carrier proteico o excipientes como manitoles, polisorbatos, fosfatos, lauril sulfato de sodio, potencialmente piretogénicos si no se ha controlado adecuadamente su calidad ⁽¹⁰²⁾.

Por otro lado y, en particular relacionado con la elaboración y control de IFAs biológicos/biotecnológicos (medios de cultivo, aditivos de crecimiento), el control de los insumos o el empleo de insumos con calidad certificada será crítico. Muchos de los productos biotecnológicos son citoquinas (factores de crecimiento, interferones, interleuquinas) y, como han descrito algunos autores, los efectos de cantidades mínimas de endotoxinas pueden ocasionar confusiones clínicas y analíticas ⁽²⁾.

Si se han empleado células bacterianas, las EB pueden considerarse una impureza originada de la pared bacteriana y será necesario removerlas durante los procesos de purificación (por procesos de exclusión molecular, intercambio iónico o adsorbentes específicos). Si las células de origen son animales, las EB pueden encontrarse como posibles contaminantes del medio de cultivo, de nutrientes, agua, y debe considerarse su presencia durante los procesos de sanitización de equipamiento como columnas de extracción o purificación.

- **Vacunas**

En el caso de vacunas, la Ph Eur incluye requerimiento del ensayo para aquellas de origen ADN recombinantes como las de hepatitis e influenza y las de origen bacteriano con antígenos derivados de grupos polisacáridos como las meningocócica y neumocócica. Para otras, recomienda la aplicación del EEB o el ensayo de piretógenos en etapas de obtención de antígenos o de las vacunas. Algunas de ellas, y en ocasiones en relación a los adyuvantes incluidos, pueden requerir especial cuidado durante las etapas de validación ⁽¹⁰³⁾.

- **Hemoderivados**

Si bien desde hace muchos años, la OMS recomendaba la aplicación del EEB para los controles de proceso de hemoderivados ⁽¹⁰⁴⁾ y FDA/USP incluían en sus listados límites de endotoxinas para albúminas, gammaglobulinas y factor antihemofílico desde inicios del 90. Sólo recientemente la Ph Eur ha reconocido al ensayo como alternativa al ensayo de piretógenos en conejos para liberación de soluciones de albúmina humana, factores de coagulación VIII y IX y gamma globulinas.

Tanto en las actualizaciones y nuevos capítulos de Ph Eur y EMA ⁽¹⁰⁵⁾ se justifica este uso alternativo, siempre que el fabricante cumpla BPM, haya identificado etapas críticas de los procesos desde los materiales de partida, intermediarios, ambientes y superficies y la carga biológica, si se tratara de bacterias Gram positivas, e incluido límites de carga microbiológica/endotoxinas.

En un relevamiento reciente ⁽⁸⁷⁾ del Instituto Nacional de enfermedades infecciosas de Japón con 19 productos derivados de la sangre (inmunoglobulinas normal y antitetánica con distintos tratamientos, anti-D, factores de coagulación VIII, IX, fibrinógeno, haptoglobina, etc), se concluyó que en todos los

casos fue posible superar, mediante diluciones entre 1/2 y 1/16-con la única excepción de Antitrombina III- la presencia de factores interferentes. Sin embargo, señalaron que el empleo de marcas comerciales de lisados reactivo que también reaccionan con sustancias no piretogénicas tales como (1,3)- β -D-glucanos, produjeron resultados positivos no asociados a endotoxinas. En nuestra experiencia reciente⁽¹⁰⁶⁾ una inmunoglobulina antitetánica de origen humano termotratada ha demostrado un comportamiento de potenciación en ensayo cinético turbidimétrico frente a distintos lotes de una misma marca comercial de lisado reactivo, que se resuelve al reconstituir el lisado reactivo con un buffer específico para endotoxinas (conteniendo CM-curdlan) bloqueante de la interferencia de los glucanos o LAL RM. Según distintos autores, la diferente reactividad de los lisados frente a estos materiales puede ser importante fuente de confusión.

Entre los años 1997 a 2005, el INAME, en distintos programas de control de albúminas, inmunoglobulinas humanas, proteínas plasmáticas de origen humano mediante el EEB y/o el ensayo de piretógenos en conejo, e encontraron resultados alentadores indicativos de compatibilidad de estos productos con el EEB y en todos los casos, el “no cumplimiento” del ensayo *in vivo* se acompañó con el “no cumplimiento” del EEB ^(92, 93).

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

Se trata de terapias multidisciplinarias con requerimientos de BPM compartidos con los IFA de biológicos, especialidades medicinales y dispositivos médicos y con las mismas recomendaciones en cuanto a la exigencia de calidad certificada en todos los insumos tanto de los procesamiento de los materiales de partida, materias primas y dispositivos médicos ⁽¹⁰⁷⁾.

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

Cuando se trate el control de coloides, suspensiones o de drogas insolubles en agua o buffers compatibles con el lisado reactivo, su solubilización con dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio, la ruptura de emulsiones puede representar un problema. Si durante la prueba preliminar de interferencias, la recuperación del “spike” se encuentra dentro de los límites aceptados, no será necesario ningún procedimiento adicional. Si se percibe una recuperación en el “borde” o se observa parte del aceite en las paredes sin recuperar, siempre puede compensarse con reducción de los límites aceptables de endotoxina. Si por el contrario, hay interferencias con la metodología de ensayo disponible, algunos expertos ^(108, 109) recomiendan, con cierta lógica, tratar una suspensión/emulsión o aceites como un dispositivo médico (dilución, agitación con vórtice en forma intermitente durante no menos de 1 hora y ensayar la fase acuosa, asumiendo que la EB irá a la fase acuosa, en caso de no estar firmemente ligada al soluto. La monografía de dimeticona (aceite de silicona) es un ejemplo de un método que incluye separación de fases. La adición de una cantidad conocida de estándar de endotoxina a la suspensión y la evaluación de su recuperación porcentual podrá ser un enfoque de validación a considerar. También se encuentran disponibles agentes dispersantes para emulsiones oleosas u otros productos en base a aceites, a los que luego de mezclar, centrifugar y separar ambas fases acuosa y aceite, se ensaya el contenido de endotoxinas en la fase acuosa.

Los liposomas –y tal vez en el futuro algún otro sistema nanoparticulado- han planteado otro desafío ya que “no puede asegurarse que no haya quedado atrapada la endotoxina dentro del liposoma junto al ingrediente activo”, o sea, enmascaran su presencia y “dramáticamente reducen su habilidad para coagular frente al lisado reactivo). Varios autores ^(110, 111) proponen como alternativa destruir, en primer término, los liposomas con surfactantes (ej. CHAPS 1.5 %V/V) y luego diluir las muestras. De no ser posible, el ensayo de piretógenos en conejos sigue siendo una alternativa conservadora.

7. Selección de métodos

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

Como norma general, en cualquier monografía particular debe incluirse un solo ensayo, preferentemente el EEB en lugar del ensayo de piretógenos ⁽¹¹²⁾ salvo especificación en contrario-, por considerarse que garantiza una protección igual o mejor para el paciente y no está sujeto a la diferencia de susceptibilidad/sensibilidad de la colonia de animales ^(113,114). Se deberá proveer toda la información que permita concluir que el EEB puede aplicarse satisfactoriamente a la sustancia o formulación de interés (detalles de preparación de la muestra, procedimientos de eliminación de factores de interferencia si aplicara, además de datos complementarios disponibles sobre el ensayo de piretógenos en conejos que puedan contribuir a garantizar que el reemplazo es adecuado, en ocasiones particulares)

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

7.2. Distintas técnicas del EEB (ensayo LAL)

Habiéndose establecido que el ensayo será el EEB, se podrá optar por sus distintas alternativas. En el primer ensayo de EB de la USP sólo se utilizaba la gelificación como criterio de evaluación. Los métodos cuantitativos cromogénicos o turbidimétricos, de punto final o cinéticos, desarrollados más tarde, requieren una instrumentación más compleja, pero pueden automatizarse más fácilmente para analizar un gran número de muestras del mismo o diferentes productos. La elección de unos u otros está vinculada en general, a la disponibilidad de equipamiento, experiencia en el laboratorio y número de muestras. En ocasiones, otras necesidades tales como necesidad de datos cuantitativos (por ejemplo para seguir un proceso de purificación durante la síntesis de un IFA convencional o biotecnológico, seguimiento de tendencias), aspectos documentales y mayores sensibilidades para productos altamente interferentes pueden mejor posicionar a las técnicas fotométricas por sobre el ensayo de gelificación, aún cuando no hay regla general, como surge de nuestra experiencia con hemoderivados/biotecnológicos ⁽¹¹⁵⁾

Actualmente, según criterios ICH armonizados, el método de gel en tubo sigue siendo considerado referente en caso de dudas y disputas ⁽⁵⁵⁾

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

7.3. Ensayo de piretógenos *in Vitro*

En el año 1996, Hartung describió un procedimiento alternativo para el EEB y el ensayo de piretógenos en conejos, basado en la activación de células sanguíneas (monocitos humanos) y la liberación de citoquinas (IL1, IL6 y TNF alfa), es decir, basado en el mismo mecanismo por el cual una EB/piretógeno exógeno produce sus efectos biológicos en animales y humanos ^(116, 117, 118). Fundamentado en ese principio, la Ph Eur ha introducido recientemente (año 2010) un ensayo alternativo al que denomina MAT (test de activación de monocitos, según sus siglas en inglés) ⁽¹¹⁹⁾. Como reactivo, emplea células sanguíneas obtenidas según las Buenas Prácticas de Medicina Transfusional y requiere de técnicas asociadas de cuantificación de niveles de IL-1 β producido mediante enzimoimmunoensayo. Si bien la Agencia regulatoria europea (EMA) ⁽¹²⁰⁾ no justifica directamente el uso de este ensayo como alternativa para el ensayo de piretógenos de productos derivados de plasma, proporciona un número de detalles que podrían ser relevantes para tal justificación (ensayos paralelos, validación del ensayo)

En la bibliografía también se lo señala como una alternativa útil para productos oleosos ⁽¹²¹⁾

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

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

cromogénico de punto final descripto).

En nuestro conocimiento, este ensayo aún no ha sido utilizado en Argentina a la fecha. Su sensibilidad estaría en el orden de la que presentan los ensayos fotométricos y no es activado por glucanos ⁽¹²²⁾. FDA admite su empleo bajo el paraguas de validación de métodos cuando éstos difieren de los compendiales ⁽⁶⁵⁾.

9. Cuestiones de Garantía de Calidad

9.1. Calificación del analista

La técnica de EB es altamente dependiente de la habilidad del analista, quien debe tener muy claro que está haciendo, y emplear buenas técnicas asépticas-no requiere ambientes especiales con filtros de alta eficiencia para no contaminar en forma inadvertida el producto durante la preparación de la muestra o durante el ensayo.

Como lo indican las buenas prácticas, la calificación del analista debe encontrarse documentada y podrá incluir la verificación de sensibilidad declarada en un rótulo de lisado para el método de gel en tubo o la demostración del cumplimiento de parámetros de linealidad de una curva de calibración para métodos fotométricos, al estilo del ítem Procedimiento de Control de calidad del lineamiento de FDA, hoy obsoleto⁽⁴⁹⁾.

9.2. Calificación de equipamiento/Validación del proceso de despirogenación

Este tema excede el propósito de este capítulo y ya fuera mencionado en la sección 4.

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

La despirogenización (se trate de una etapa del proceso productivo o pro-analítico) debe ser validada. En referencia al proceso de despirogenización en seco, la USP ⁽⁴⁴⁾ indica que el desafío con pirogénos debería ser parte integral del programa de validación y a modo de ejemplo cita la inoculación de uno o mas artículos a ser tratados (despirogenado) con 1.000 o más unidades EU de EB.

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

En distintos documentos, el lector podrá ilustrarse acerca de los diferentes detalles a tener en cuenta durante este proceso, los cuales deberán estar bien definidos en procedimientos internos: número de contenedores con EB –húmedos o secos- por posición, configuraciones de carga: vacío y “peor caso de carga”, ubicación - seleccionando los “puntos más fríos-”, procedimientos para la extracción. Finalmente, el cálculo deberá relacionar el nivel de endotoxina “recuperable” en recipientes sin tratamiento (como mínimo 1.000 UE/contenedor) y el nivel de endotoxinas efectivamente recuperado al someter al ciclo de despirogenado seleccionado, para considerar si el proceso ha sido realmente efectivo^(123,124,125,126,127,128,29,130)

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

9.3. Situaciones que requerirán nuevas pruebas de interferencias

Las pruebas de interferencia deberán repetirse en las siguientes situaciones ⁽³⁾:

- Cambio de marca de lisado reactivo /CSE
- Cambio (disminución) en la sensibilidad del lisado

- Cambio en parámetros del ensayo (ejemplo, método de extracción de la muestra)
- Cambio de condiciones del ensayo (ejemplo, uso de buffers para reconstitución del lisado en lugar de agua reactivo)
- Reiterados problemas de interferencias
- Cambio de límite de endotoxinas (disminución) si durante la etapa de validación anterior la concentración a ensayar no hubiera sido contemplada
- Cambios de tipo de análisis de regresión en métodos cinéticos (regresión polinomial en lugar de la comúnmente empleada regresión lineal)
- Cambio relevante en formulación o de composición de un dispositivo médico o un envase primero/cierre
- Cambio de metodología (por ej. técnica de gel en tubo por técnica fotométrica).
- Cambios en procesos de fabricación o formulación del producto. Considerando que el control de recuperación del “spike” es rutinario, con cada ensayo, este podría considerarse como reaseguro /verificación cotidiana en caso de cambios menores en formulación y proceso.

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

En ocasiones, podemos enfrentar situaciones “fuera de control” con un producto o con el ensayo.

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

En caso de resultados fuera de especificaciones, deberá llevarse adelante una investigación que permita descartar errores propios del laboratorio, de una manera sistemática según un procedimiento *ad hoc*, en el que se incluirá la secuencia de re-ensayos e interpretaciones posibles según resultados ^(131,132). Esta investigación incluirá, como mínimo, la revisión del método analítico y aseguramiento de su ejecución correcta por parte del analista, equipos e instrumentos y su calificación, controles, preparación y almacenamiento de reactivos y estándares, curvas de calibración, cálculos, muestreo y, antecedentes. Las acciones preventivas/correctivas a tomar dependerán del resultado de esta investigación y si no se identificara un error de laboratorio, se extenderá al proceso de manufactura y eventualmente al muestreo.

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

10. Cierre

El análisis de EB es fundamental en la elaboración y control de calidad de inyectables y de otros productos enumerados en este capítulo, debido a su impacto en la salud humana: su presencia puede causar efectos adversos serios a graves incluyendo la muerte. Desde los tempranos '80 hasta la fecha, hemos incorporado numerosos conceptos sobre la química y funcionalidad de las EB y sobre las distintas metodologías para su prevención, detección y cuantificación. Las farmacopeas internacionalmente reconocidas han armonizado los requisitos para el ensayo y nuestra FNA lo incluyó en su última edición. Paulatinamente, las monografías fueron reemplazando el clásico ensayo de pirogénos en conejos por el EEB, con algunas pocas excepciones dentro del grupo de biológicos o formas farmacéuticas especiales. Mientras tanto, en la última década, aparece un

ingenioso ensayo *in vitro* que intenta reproducir la respuesta humana a los pirogenos exógenos, recientemente incorporado a compendios.

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

11. Agradecimientos

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

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

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

Y fundamentalmente, a nuestras familias por su eterna paciencia

Bibliografía

1. Bennett, IL Jr, *Introduction: approaches to the mechanisms of endotoxin action*, p xiii-xvi in M Landy and W Braun (ed.) *Bacterial endotoxins*. The Institute of Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey, Rahway, 1964
2. *Endotoxins. Pyrogen, LAL testing and Depyrogenation*. Kevin L Williams. Marcel Dekker Inc Second Edition, Revised and Expanded, 2001
3. *Bacterial endotoxins-test methodologies, routine monitoring and alternatives to batch testing Association for the Advancement of Medical Instrumentation Association for the Advancement of Medical Instrumentation ANSI/AAMI ST72 2002/(R) , 2010*
4. Greisman SE and Hornick RB *Comparative pyrogen reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin*. *Proc Soc Exp Biol Med* 131(4): 1154-8, 1969
5. Dinarello C *Interleukin 1 Reviews of infections diseases*, 6, 51-95, 1984
6. Dinarello C *Interleukin 1 and the pathogenesis of the acute phase response*. *The New England Journal of Medicine* 311(22):1413-1418, 1984
7. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schurmann RR, Rauchaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJS and Anker SD *Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study*. *The Lancet* 353, may 29 1999
8. Galanos C and Freudenberg MA *Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action Mediators of inflammation Vol 2 (Supplement) :11-16, 1993*
9. Pfeiffer R *Investigation about the Cholera Poison Z Hyg.* 11: 393-412, 1896
10. Centanni E, *Untersuchungen uber das Infektionsfieber-das Antitoxin des Bakterienfiebers Dtsch Med Wochenschr* 20: 270,1894
11. Raetz CRH *Minireview Bacterial Endotoxins: Extraordinary Lipids That Activate Eucaryotic Signal Transduction*, *J of Bacteriology* 175 (18): 5745-5753, 1993
12. Tanamoto K-I *Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin Methods in Enzymology* 236, 31-41,1994
13. Mozes T, Ben-Efraim S and Bonta IL *Lethal and non-lethal course of endotoxin shock is determined by interactions between TNF, platelet activating factor and eicosanoids Pathol Biol (Paris)* 40(8): 807-12, 1992.

14. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer A J, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M and Brade H *Bacterial endotoxin: molecular relationship to structure to activity and function* FASEB J. 8: 217-225, 1994.
15. Novitsky T J, Schmidt-Gengenbach J and Remillard J F *Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces* J Parenter Sci Technol 40: 284-286, 1986
16. Roslansky P F, Dawson M E and Novitsky T *Plastics, endotoxins and the Limulus Amebocyte Lysate Test* J Parenteral Science & Technology 45, 2: 83-87, 1991
17. Petsch D and Anspach FB, *Endotoxin removal from protein solutions* J of Biotechnology, 76 (97): 119, 2000
18. Galanos C, Freudenberg MA, Luderitz O, Rietschel ET and Westphal O, *Chemical, physicochemical and biological properties of Bacterial Lipopolysaccharides*, Prog Clin Biol Res. 29: 321-32, 1979
19. Depyrogenation Technical Report N° 7 Parenteral Drug Association Inc 1985
20. Weary M and Pearson III Frederick *A manufacturer's guide to depyrogenation* Biopharm 1 (4): 22-29, 1988
21. Bacterial endotoxins <85>USP 36
22. Karbachsch, M. Steinhoff G and Monzani, H *Depyrogenation of solutions of low molecular weight substances by ultrafiltration* M Karbachsch, Drugs made in Germany 27: 45-84, 1984
23. Rafiee-Tehrani M, Farrokhnia R, Falkenhagen D and Weber C *Removal of lipid A and Pseudomonas aeruginosa endotoxin from dialysis fluids by high-flux polysulfone ultrafilter (dialyzer)* PDA J Pharm Sci Tech 50 (5): 306-310, 1996
24. Issekutz AC *Removal of Gram negative endotoxin from Solutions by affinity chromatography* J Immunol Methods 61: 275-281, 1983
25. Petsch D, Deckwer WD and Anspach FB *Proteinase K Digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate assay: application of endotoxin removal from cationic proteins* Analytical Biochemistry 259: 42-47, 1998
26. Nawata M, Minobe S, Hase M, Watanabe T, Sato T and Sosa T *Specific assay for endotoxin using immobilized histidine, Limulus amoebocyte lysate and a chromogenic substrate.* J Chromatogr. 24 ; 597 (1-2):415-24, 1992
27. Morrison DC and Jacobs DM. *Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides immunochemistry* Immunochemistry 13: 813-838, 1976
28. H. Schultz H, Weiss J, Carroll SF and Gross W L *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an endotoxin-binding neutrophil leukocyte-granule protein with antibacterial* J. Leukoc. Biol. 69: 505-512, 2001
29. Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB Scott RW *The role of the Bactericidal Permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin* The J of Immunology 148: 532-537, 1992
30. Nachum R, Siegel SE, Sullivan JD, Watson SW *Inactivation of endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate* J Invert Pathol 32: 51-58, 1978
31. Pérola O. Magalhães, André M. Lopes, Priscila G. Mazzola, Carlota Rangel-Yagui, Thereza C. V. Penna, Adalberto Pessoa, *Methods of endotoxin removal from biological preparations A Review.* J Pharm Pharmaceut Sci 10(3):388-404, 2007
32. The Microbiological Update. Editor Murray Cooper 16 (11) 1999
33. Giampaolo B, Fernández Gianotti T, Fraga G, Kairiyama E, Menna M. y Salas E. *Gamma radiation resistance. Bacterial Endotoxin parts I-II: preparation of endotoxin indicators for analysis of cryopreserved skin allografts Tissue Banking Latin America.* Hospital das Clínicas- Faculdade de Medicina Universidade de Sao Paulo, Brazil. 2000

34. Giampaolo B, Kairiyama E; Fernández Gianotti T, Fraga G, Fara, ML y Piccoli A. 2002 *Proceso de Radioesterilización de injertos de piel. Control de Endotoxinas Bacterianas* IX Congreso de SAFyBI, 2002
35. Fernández Gianotti T, Fraga G, Kairiyama E, Giampaolo B, Menna M, Arrúa J, Lamas G, Horack.C *Radiation sterilization of criopreserved skin allografts and radiation effects on bacterial endotoxins* Second World Congress on Tissue Banking and 8th International conference of EATB Warsaw, Poland, 1999
36. Galanos C et al *Biological activities of lipid A complexed with Bovine Serum Albumins* Eur J Biochem 31 (2): 230-3, 1972
37. Niwa M et al *Alteration of Physical, Chemical and Biological Properties of Endotoxin by treatment with mild alkali* J Bacteriol 97 (3): 1069-1077, 1969
38. Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos. Disposición ANMAT N° 2819/2004 (con las modificaciones de la Disposición ANMAT N° 4844/2005)
39. Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos” y la “Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación” Disposición ANMAT 2372/2008
40. Buenas Prácticas de Fabricación y Control de Soluciones Parenterales de Gran volumen. Disposición ANMAT 1149/97
41. Note for guidance on quality of water for pharmaceutical use CPMP/CVMP, EMEA; May 2002
42. Water for injections, European Pharmacopoeia 7.0
43. Water for pharmaceutical uses < 1231> USP 36
44. Sterilization and sterility assurance of compendial articles <1211> USP 36
45. Levin J and Bang FB *A description of cellular coagulation in the Limulus* Bull Johns Hopkins Hosp 337-45, 1964
46. Cooper JF, Levin J and Wagner HN *New Rapid in Vitro test for Pyrogen in short lived radiopharmaceuticals* J Nuclear Medicine 11: 10, 1970
47. Pearson FC, Weary ME, Sargent HE, Novitsky TJ, Lin H, Lindsay G, Berzofsky RN, Lane AL, Wilson JD, Cooper JF, Helme JE, Twohy CW, Basch HI, Rech M, Slade JW and Winegar MP. *Comparison of several control standard endotoxins to the National Reference Standard Endotoxin- an HIMA Collaborative Study* Applied and Environmental Microbiology, 50 (1): 91-93, 1985
48. Mascoli CC and Weary ME *Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials* J Parenteral Drug Assoc 33: 81-95, 1979
49. Guideline on validation of the Limulus amebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. U.S: Food and Drug Administration: DHHS, December 1987
50. Iwanaga S, Morita T, Hande T and Nakamura S *Chromogenic Substrats for horseshoe Crab clotting enzyme* Haemostasis 7 : 183-188, 1978
51. Nakamura S, Takagi T, Iwanaga S et col. *A Clottable Protein (Coagulogen) of Horseshoe Crab Hemocytes. Structural Change of Its Polypeptide Chain during Gel Formation* .J Biochem, 80 (3): 649-652, 1976
52. Lindsay G, Roslansky and Novisky T *Single step, Chromogenic Limulus amebocyte Lysate Assay for endotoxin* J.Clin Microbiol 27: 947-951, 1989
53. Mondelo N.; Piccinni E *Detección de endotoxinas bacterianas en productos oncológicos*. Actas de las I Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1988
54. Pharmacopoeial Forum 17: 4, 1991
55. Evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts. for use in the ICH regions on Bacterial Endotoxins test general chapter ICH Q4B Annex 14, October 2012.

56. Human normal immunoglobulin, human immunoglobulin for intravenous administration and human blood coagulation factor VIII European Pharmacopoeia 6
57. Bacterial endotoxins 2.6.1.4 European Pharmacopoeia 7
58. Endotoxinas Bacterianas <330> Farmacopea Argentina, Séptima edición
59. Karen Zink Mc Cullough *Constructing and interpreting standard curves for quantitative BET assays The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, Karen Zink Mc Cullough, PDA, Bethesda, MD, USA, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011
60. *Endotoxin Reference Standard Harmonized Serves Worldwide Community* -The Standard, nov dec 1997
61. Cooper JF The necessity of reliable endotoxin standards LAL times 5 (4) 1998
62. Poole, S., Dawson, P., Gaines Das, R.E. *Second international standard for endotoxin: calibration in an international collaborative study*. JI of Endotoxin Research 4 (3), 221-231, 1997.
63. Harmonization of Endotoxin Standards and Units LAL update 15 (4) , 1997
64. BET USP Pharmacopoeial Forum 26 (1) 85: 218, 2000
65. FDA Guidance for Industry Pyrogens and Endotoxins testing Questions and Answers-June 2012
66. Weary ME The USP Bacterial Endotoxin test <85> In: USP workshops on microbiology and pharmaceutical water, San Juan, 214-218 April 1997
67. Duner KL *The importance of the quality of Water in Limulus Amebocyte Lysate Tests* PDA J of Pharm Sci Tech , 49 (3), p. 119-121, 1995
68. Dr Thye Yin, Haemachem 1992 (comunicación personal)
69. Mondelo N, Garcia Castro F, Piccinni E. *Importancia del agua en el ensayo de detección de endotoxinas bacterianas*. Actas de las III Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1992
70. Syringes can inhibit CSE activity Chromogenix, 2002
71. Roslansky PF, Dawson ME and Novitsky TJ, *Plastics, endotoxins and the Limulus Amebocyte Lysate Test* J Parenter Sci Technol 45 (2), 83-87, 1991
72. Fife LA and Dawson ME *Laboratory disposables and the LAL test* LAL update 22 (1): 1-3, 2005
73. Weary ME *Understanding and setting endotoxin limits*, Journal of Parenteral Science and Technology, 44 (1): 16-18,1990
74. Cooper J F *Principles and applications of the Limulus test for pyrogens in parenteral drugs* Bull Parental Drug Assoc 29 (2): 122-130, 1975
75. L Bennet Jr RG Petersdorf and WR Keene *Pathogenesis of fever: evidence for direct cerebral action of bacterial endotoxins* Trans Ass Am Physicians 70, 64-73, 1957
76. Decision of limits for Bacterial endotoxins Japanese Pharmacopoeia 2006
77. Twohy CW, Duran AP, Peeler JT. Extraction of bacterial endotoxin from medical devices. *J Parenter Sci Technol* 40(6):287-91,1986
78. Williams K Developing an Endotoxin Control Strategy for Parenteral Drug Substances and Excipients. *Pharm Technol* September : 20-24, 1998
79. Cooper J *Resolving LAL test interferences* PDA J Phar Sci Tech, 44 (1):13-15.1990
80. Dubczak J *Resolving LAL interferences The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, Karen Zink Mc Cullough, PDA, Bethesda, MD, USA, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011
81. Giampaolo, B *Ensayo de Endotoxinas bacterianas (Limulus test)* Revista SAFYBI. 31 (84): 61-73, 1991.
82. Michael E Dawson, *Understanding reaction basics The Bacterial Endotoxins Test: a practical approach*, Karen Zink Mc Cullough, PDA, Bethesda, MD, USA, DHI Publishing, LLC, River Grove, IL, USA, 2011
83. Steindler K, Tsuji K and Enzinger M Potentiating Effect of Calcium Gluconate on the *Limulus Amebocyte*

- Lysate (LAL) Gelation- End point Assay for Endotoxin. J Parenter Sci Technol 35(5): 242- 246, 1981
84. Giampaolo B, Fraga G, Pardo V, Albertengo M.E *Efecto de los anticoagulantes en el ensayo de Endotoxinas Bacterianas*. VI Congreso Argentino de Farmacia y Bioquímica Industrial, 1993
 85. Giampaolo, B.N Y Araldi, H.T. *Limulus Test en el Control de Calidad. Guía de Trabajos Prácticos Valoraciones Biológicas*. Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad de Buenos Aires. Argentina, 1986
 86. Giampaolo B.,Fraga G. y Albertengo M. 1995 *Efectos de los concentrados de Factores VIII y IX en el ensayo de Endotoxinas Bacterianas* II Congreso Federación farmacéutica Sudamericana. VI reunión Latinoamericana de Ciencias Farmacéuticas. Santiago de Chile, Chile, 1995
 87. M Ochiai, A Yamamoto, S Naito, J-i Maeyama, A Masumi, I Hamaguchi, Y Horiuchi, K Yamaguchi *Applicability of bacterial endotoxin test to varios blood products by the use of endotoxin-specific lysates* Biologicals 38: 629-636, 2010
 88. Roslansky PF, Novitsky TJ *Sensitivity of Limulus Amebocyte Lysate (LAL) to LAL-reactive glucans* J Clin Microbiol, 29 (11): 2477-83, 1991
 89. Cooper JF, Weary ME, Jordan FT *The impact of non endotoxin LAL-reactive materials on Limulus Amebocyte lysate analyzers* PDA J Pharm Sci Technol, 51 (1):2-6 ,1997
 90. Mc Cullough KZ *Variability in the LAL test* J Parenter Sci Technol 44 (1): 19-21,1990
 91. Giampaolo B, Fraga G, Oliva L y Albertengo ME *Efectos del TPA y las heparinas sobre el mecanismo de reacción del Limulus test* II Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis Mar del Plata, Argentina,1996
 92. Fraga G, Giampaolo B. et col. *Especialidades medicinales derivadas de plasma humano: control de sustancias pirogénicas* CLAMME 2005.
 93. Cooper JF *Validation of bacterial endotoxins test methods* LAL times, 2, 2, 1999
 94. Cooper JF *Using validation to reduce LAL pH measurements* LAL times 4 (2) 1-3, 1997
 95. Transfusion and infusión assemblies and similar medical devices USP<161>
 96. Radiopharmaceuticals for PET-compounding <823> USP 36
 97. Biologics <1041> USP 36
 98. Biotechnology-derived articles <1045> USP 36
 99. Good manufacturing practices for bulk pharmaceutical excipients <1078> USP 36
 100. Water for pharmaceutical purposes <1231> USP 36
 101. Injections <1> USP 36
 102. Fraga H, Giampaolo B, Albertengo ME *Control de Endotoxinas Bacterianas en Productos Biológicos obtenidos por técnicas ADN recombinantes. Importancia de la expresión de Unidades*, Revista SAFYBI 38 (98) , 1999
 103. Ochiai M, Yamamoto A, Toyoizumi H and Y Horluchi *Interfering effect of Diphteria-Tetanus-Acellular Pertussis combined (DTaP) vaccines on the Bacterial Endotoxin Test* Biologicals, 29: 55-58, 2001
 104. WHO expert committee on biological standardization technical report series. 43rd Report: number 840, 1994
 105. Addendum on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products.EMA CHMP/BWP/452081/2007.
 106. Mondelo N (Gador SA), Comunicación personal, 2011
 107. Powers JL and Dawson ME *Endotoxin testing of cellular and tissue based therapies* LAL update, 24 (1): 1-3, 2008

108. Jill Schultz, Charles River Endosafe, Comunicación personal, 2003
109. Paulsen, J and Per Michaelsen *The Limulus ameobocyte lysate (LAL) assay for the detection of endotoxin in fat emulsions for total parenteral nutrition*. Acta Path microbiol scandinavica Series B: Microbiologia 92B, 1-6,:177-179 1984.
110. Piluso LG and Martinez MY *Resolving Liposomal inhibition of quantitative LAL Methods J Pharm Sci Techn*, 53 (5) : 260-263, 1999
111. Harmon P, Cabral-Lilly D, Reed R A, Mauro F *The release and detection of endotoxin from Liposomes Analytical Biochemistry* 250: 139-146, 1997
112. Ensayo de pirogénos <340> Farmacopea Argentina, Séptima Edición
113. Mondelo N y Piccinni E *Respuesta febril de distintas colonias de conejos frente a una endotoxina purificada* Revista SAFyBI 31 (85): 17-23, 1991
114. Beom-Jun L and Yong-Soon L *Influence of low or high endotoxin-susceptible Rabbit on pyrogen test* Korean J Toxicol 4, 2 : 181-188, 1988
115. Fraga G y Giampaolo B *Sustancias piretogénicas ensayos in vivo e in vitro de endotoxinas bacterianas: métodos alternativos* Jornadas de Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Bs. As. 2008
116. Hartung T and Wendel A *Detection of pyrogens using human whole blood In Vitro Toxicol*,9 : 353-359, 1996
117. Poole S and Gaines Das RE *Towards A "human pyrogen test"* European Journal of Parenteral Sciences, 6 (2): 6-64, 2001
118. Spreitzer I, Loschner B, Schneider CK, Hanschmann KM and Montag T *10 years of experience with alternative pyrogen tests (monocyte activation tests)* AATEX 34, Special Issue: 587-589, 2007
119. Monocyte Activation Test <2.6.30> European Pharmacopoeia 7.8
120. Note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/05 rev 3). Addendum on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products (EMA/CHMP/BWP/452081/2007)
121. Schindeler, S, Rosenberg .D et. col. *Pyrogen testing of lipidic parenterals with a novel in vitro test- Application of the in vitro pyrogen test based on cryopreserved human whole blood*. Pharmeuropa Scientific Notes, 1: 1-7. 2006
122. Ding JL and Ho B *Endotoxin Detection-from Limulus Ameobocyte Lysate to recombinant Factor C* In Wang X, Quinn PJ Eds *Subcellular Biochemistry: Endotoxins, Structure, Function and Recognition* Vol 53: 157-158, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York 2010
123. Bacterial endotoxin testing (BET) Depyrogenation and endotoxin recovery. The Microbiological Update vol 12, 9, December 1994
124. Tohru Nakata *Destruction of typical endotoxins by dry heat as determined using LAL assay and pyrogen assay* PDA JI of Parenteral Science & Technology Vol 47,5: 258-264 , 1993
125. LAL Users Group. *Preparation and Use of Endotoxin Indicators for depyrogenation process* Studies Journal of Parenteral Science & Technology 43 ,3, 1989
126. Tohru Nakata *Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven* Journal of Parenteral Science & Technology 48,2 : 59-63, 1994
127. Hecker W, Witthauer D and Staerk. *A Validation of dry heat inactivation of bacterial endotoxins* PDA J of Parenteral Science & Technology 48 (4): 197-204, 1994
128. Novitsky T, Schmidt-Gengenbach J, Remillard J *Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces* Journal of Parenteral Science & Technology 40 (6,): 284-285, 1986
129. *Validation of dry heat processes used for sterilization and depyrogenation* Technical Report N° 3

Parenteral Drug Association 1981

130. Akers M J, Ketron K M, Thompson B *F value requirements for the destruction of endotoxin in the validation of dry heat sterilization/ depyrogenation cycles* JI of Parenteral Science &Technology 36,1: 23-27, 1982
131. *Investigating OOS test results for pharmaceutical production* US DHHS CDERFDA October 2006
132. LAL times. *FDA Draft guidance for industry: investigating OOS test results for pharmaceutical production.* Dec 1998

Control microbiológico de medicamentos no obligatoriamente estériles

María Cristina Fernández

- *Consideraciones generales*
- *Métodos de Recuentos Microbianos*
- *Ensayos de microorganismos específicos*
- *Soluciones y medios de cultivos*

Consideraciones generales

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

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

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

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

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

- la vía de administración
- la naturaleza del producto
- los pacientes a los cuales está destinado

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I. MÉTODOS DE RECuentOS MICROBIANOS

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

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

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

I. 2. Preparación de los microorganismos de ensayo

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

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

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

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

I. 3. Control negativo

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

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

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

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

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

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

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

Preparación de la muestra.

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

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

Tabla 3. Preparación y uso de los microorganismos de ensayo

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

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

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

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

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

I. 6. Inoculación y dilución

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

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

I. 7. Neutralización/ eliminación de la actividad antimicrobiana

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

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

La modificación del procedimiento puede incluir, por ejemplo, 1) un aumento del volumen del diluyente o del medio de cultivo, 2) la incorporación al diluyente de agentes neutralizantes específicos o generales, 3) una filtración por membrana, o 4) una combinación de las modificaciones anteriores.

I. 8. Agentes neutralizantes

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

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

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

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

I.9.a Filtración por membrana.

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

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

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

I.9.b Métodos de recuento en placa.

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

I.9.b.1 Método de vertido en placa

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

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

Para placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a cada placa 15-20 mL de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o de agar-agar glucosado de Sabouraud a una temperatura de aproximadamente 45 °C y dejar que solidifique. Si se usan placas de Petri más grandes, el volumen del agar-agar se aumenta proporcionalmente. Secar las placas, por ejemplo en una cabina de flujo laminar o en una incubadora. Para cada uno de los microorganismos citados en la Tabla 3 se usan al menos 2 placas de Petri. Extender un volumen medido, no inferior a 0,1 mL de la muestra preparada como se ha descrito en I.5 sobre la superficie del medio.

Incubar y contar como se ha descrito en I.9.b.1.

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

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

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

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

I. 10. Resultados e interpretación

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

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

I. 11. Ensayo de los productos.

I.11.a. Cantidad de muestra a ensayar

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

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

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

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

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

Tabla 4. – Valores del número más probable de microorganismos

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

I.11.b. Examen del producto

I.11.b.1 Filtración por membrana

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

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

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

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

- *Método de vertido en placa*

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

- *Método en superficie*

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

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

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

I.11.c. Interpretación de los resultados

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

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

10¹ UFC: número máximo aceptable = 20;

10² UFC: número máximo aceptable = 200;

10³ UFC: número máximo aceptable = 2000, y así sucesivamente.

II. ENSAYO DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS.

Los métodos descritos en el presente ítem son los descritos por la Farmacopea Europea armonizada (3).

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

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

II. 1. Preparación de las cepas de ensayo

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

II.1.1. Microorganismos aerobios

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

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

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

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

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

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

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

II.1.2 Clostridios.

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

II. 2. Control negativo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- *Ensayo para determinar las propiedades indicativas:*

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

II. 4. Idoneidad del método de ensayo

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

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

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

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

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

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

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

II. 5. Ensayos realizados a los productos

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

- Preparación de la muestra y pre-incubación.

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

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

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

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

- *Ensayo cuantitativo*

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

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

Tabla 6. Interpretación de los resultados

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

II.5.2. Investigación de *Escherichia coli*

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

II.5.3. Investigación de salmonelas

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

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

- *Selección y subcultivo.*

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

- *Interpretación.*

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

II.5.4. Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

- *Selección y subcultivo.*

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

- *Interpretación.*

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

II.5.5. Investigación de *Staphylococcus aureus*

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

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

- *Selección y subcultivo.*

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

- *Interpretación.*

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

II.5.6. Investigación de *Clostridios*

- *Preparación de la muestra y tratamiento térmico.*

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

- *Selección y subcultivo.*

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

- *Interpretación.*

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

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

II.5.7. Investigación de *Candida albicans*

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

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

- *Selección y subcultivo.*

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

- *Interpretación.*

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

III. INVESTIGACIÓN DE PRESENCIA DE GÉRMEENES REVIVIFICABLES.

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

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

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

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

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

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

* alternativo *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

** alternativo *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482

IV. DILUYENTES Y MEDIOS DE CULTIVO RECOMENDADOS

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

Disolución tampón madre. Introducir 34 g de dihidrogenofosfato de potasio en un matraz aforado de 1000 mL, disolver en 500 mL de agua purificada, ajustar a pH 7,2 ± 0,2 con hidróxido de sodio, diluir hasta 1000,0 mL con

agua purificada y mezclar. Distribuir en envases y esterilizar. Conservar a 2-8 °C.

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

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

Dihidrogenofosfato de potasio	3,6 g
Hidrogenofosfato de sodio dihidrato	7,2 g, equivalente a fosfato 0,067 M
Cloruro de sodio	4,3 g
Peptona (de carne o caseína)	1,0 g
Agua purificada	1000 mL
Esterilizar en autoclave según un ciclo validado.	

Caldo con hidrolizado de caseína y de soja

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

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

Agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja

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

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

Agar-agar glucosado de Sabouraud

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

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

Agar-agar con patata-dextrosa

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

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

ciclo validado.

Caldo glucosado de Sabouraud

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

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

Caldo para enriquecimiento en enterobacterias de Mossel

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

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

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

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

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

Caldo de MacConkey

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

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

Agar-agar de MacConkey

Hidrolizado pancreático de gelatina	17,0 g
Peptonas (de carne y caseína)	3,0 g

Lactosa monohidrato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sales biliares	1,5 g
Agar-agar	13,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Violeta cristal	1 mg
Agua purificada	1000 mL

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

Caldo para enriquecimiento en salmonelas de Rappaport y Vassiliadis

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

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

Agar-agar con xilosa, lisina y desoxicolato

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

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

Agar-agar con cetrimida

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

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

Agar-agar con manitol-sal

Hidrolizado pancreático de caseína	5,0 g
Hidrolizado péptico de tejido animal	5,0 g
Extracto de vaca	1,0 g
D-Manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Agar-agar	15,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agua purificada	1000 mL

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

Medio reforzado para clostridios

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

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

Agar-agar Columbia

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

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

Bibliografía

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

Verificación de la aptitud de métodos microbiológicos

Sergio Iglesias

- *Introducción*
- *Ensayo de aptitud de los métodos de control microbiológico*
- *Ensayo preliminar*
- *Aptitud de los ensayos de efectividad antimicrobiana*
- *Conclusiones*
- *Bibliografía*

Introducción

El objetivo de demostrar la aptitud de los métodos microbiológicos de recuperación de microorganismos que están presentes en una muestra, es confirmar que el método elegido para cuantificar o estimar su presencia es adecuado y confiable. Sin esta demostración, un ensayo de esterilidad negativo, una placa de recuento con o sin colonias, o la determinación de la ausencia de un microorganismo objetable, no aseguran que el resultado que se obtiene representa la verdadera estimación de la población microbiana existente en la muestra en análisis. Esto puede deberse a que la muestra a analizar inhibe el crecimiento microbiano o a que el método empleado interfiere o que no sea el óptimo para asegurar la recuperación de los microorganismos presentes en la muestra. Es importante remarcar que, si un microorganismo se encuentra presente en una muestra, no necesariamente significa que se lo pueda detectar, ya que:

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

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

En el laboratorio de Microbiología de la industria farmacéutica la demostración de la aptitud de un método es apropiada para cualquier ensayo, ya sea para determinar la efectividad antimicrobiana de una formulación ⁽³⁾, la carga microbiana de una muestra ⁽⁴⁾, la detección de un microorganismo específico u objetable ⁽⁵⁾, la esterilidad

de un producto ⁽⁶⁾, la eficacia de un desinfectante, la efectividad de las técnicas de monitoreo ambiental, o cualquier otro ensayo descrito o no en farmacopeas.

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

Ensayo de aptitud de los métodos de control microbiológico

1. ¿Por qué realizarlo?

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

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

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

2. ¿Cuándo realizarlo?

2.1- Cuando nunca se realizó:

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

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

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

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

- Cambio de técnica de análisis (Ej., técnica de volcado en placa por técnica de filtración por membrana o viceversa)
- Cambio en la metodología (Ej., técnica de filtración por un sistema abierto a filtración empleando una

sistema cerrado)

- Cambio de un medio de cultivo (Ej., cambio en la formulación de un medio, implementación de nuevos medios, etc.)
- Cambio de las condiciones de incubación

2.4- Cuando cambia una exigencia regulatoria ⁽²⁹⁾:

- A partir de la armonización de las farmacopeas, y específicamente en Argentina a partir de la Disposición 7667/10, el recuento aeróbico total obtenido en las placas de TSA (Agar de Triptona de Soja) debe incluir el conteo de todas las colonias desarrolladas en dicho medio, por lo que el ensayo de aptitud de una técnica debe incluir cepas bacterianas, levaduras y de hongos filamentosos en este medio de cultivo. ^(4 y 9)
- Establecimiento de nuevas cepas de referencia para realizar los ensayos de aptitud. ^(4, 5, 8 y 9)

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

- Introducción del producto en mercados con diferentes requerimientos
- Cambio en la vía de administración
- Cambio de forma farmacéutica

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

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

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

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

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

4. Procedimiento

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

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

- a. La naturaleza de los microorganismos usados como inóculo
- b. La preparación de los inóculos

- c. Las condiciones específicas del método
- d. Las condiciones de recuperación de los inóculos

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

Los cultivos a utilizar en la determinación de la aptitud de los ensayos microbiológicos no deben exceder los 5 pasajes desde el cultivo original (se considera un pasaje a toda aquella multiplicación celular en un medio de cultivo), ya que en cada pasaje aumenta la probabilidad de acumulación de mutaciones en el genoma bacteriano (31, 32, 33 y 34). Deben proceder de centros especializados en cultivos microbianos, donde se pueda realizar la trazabilidad del origen y mantenimiento de las cepas. Como por ejemplo:

ATCC: American Type Culture Collection (Estados Unidos)

CIP: Collection de Bactéries de L' Institut Pasteur (Francia)

NCTC: National Collection of Type Cultures (Inglaterra)

IMI : International Mycological Institute (Inglaterra)

DSMZ: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (Alemania)

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

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de esterilidad son: (6 y 8)

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

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de recuento de productos no obligatoriamente estériles son: (4 y 9)

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

Los microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo de detección de microorganismos específicos de productos no obligatoriamente estériles son: (5 y 10)

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

Será de suma importancia y utilidad considerar incluir en la determinación de la aptitud de las técnicas, a los microorganismos recurrentes, presentes en los aislamientos ambientales de las áreas de producción, preparación y acondicionado de los productos, como así también microorganismos habitualmente aislados en el producto y/o en los envases primarios del mismo, ya que estos microorganismos son potenciales contaminantes que la técnica de análisis debe poder recuperar e identificar.

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

Se deben estandarizar:

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

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

- Bacterias: Crecimiento en medio TSA o TSB (Trypticase Soy Broth) durante 24 hs. a 30-35° C.
- Levaduras: Crecimiento en medio Sabouraud durante 1 a 3 días a 20-25° C.
- Hongos: Crecimiento en medio Sabouraud durante 5 a 7 días a 20-25° C.

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

Obtención de suspensiones de microorganismos con un recuento conocido:

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

Con respecto a las suspensiones que se utilizarán como inóculo, las farmacopeas recomiendan ^(4 y 9):

- Usar las suspensiones dentro de las 2 horas de preparadas, o dentro de las 24 horas siguientes, si se almacenan entre 2-8° C
- Las suspensiones de esporas (*B. subtilis* o *A. brasiliensis*) pueden ser mantenidas entre 2-8° C por un período mayor, pero éste debe ser validado.

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

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

1. Neutralización por agregado de sustancias antagonistas:

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

La neutralización enzimática consiste en el agregado de una enzima específica que degrada al componente inhibidor (Tabla I).

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

Tabla I: Neutralizantes más utilizados (4, 9, 21, 22 y 23)

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

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

TOXICIDAD y EFICACIA:

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

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

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

Tabla II Toxicidad potencial ^(23, 24 y 30)

Neutralizante	Toxicidad potencial
Bisulfato	Células vegetativas
Glicina	Células en crecimiento
Lecitina	Bacterias
Tioglicolato	Esporas y <i>Staphylococcus</i>
Tiosulfato	<i>Staphylococcus</i>

2. Neutralización por dilución:

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

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

Donde:

C = es la concentración del agente antimicrobiano

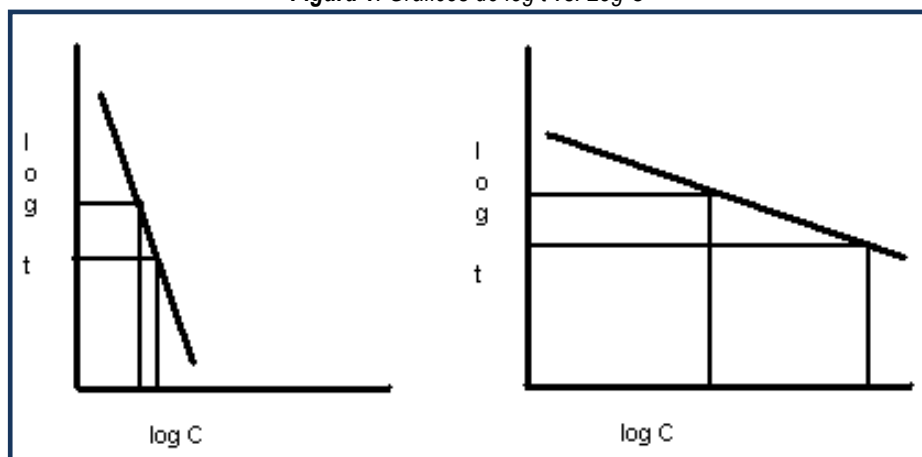
t = es el tiempo de contacto requerido para matar un determinado inóculo

k = es una constante específica para cada agente antimicrobiano

η = es la pendiente obtenida de graficar $\log t$ versus $\log C$

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

Figura 1: Gráficos de $\log t$ vs. $\log C$



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

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

- Cambio del factor de dilución de 1:10 a 1:20 o mayor, siempre que la especificación del producto lo

permita.

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

Tabla III (25 y 27). Valor η para algunos agentes antimicrobianos.

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

3. Neutralización por filtración:

La neutralización ejercida por el método de filtración está basada en la retención física de los microorganismos en la membrana y el pasaje del agente antimicrobiano a través de ella. Si quedara un remanente del agente inhibidor, éste puede ser eliminado con sucesivos lavados. Estos lavados pueden realizarse con o sin agregado de agentes neutralizantes. Se debe tener muy en cuenta al realizar el ensayo de aptitud del método el tipo de membrana, las características del material de fabricación y la porosidad; especialmente elegir membranas con baja interacción con los productos en análisis, como así también membranas con bordes hidrófobos que evitan la acumulación de producto en los bordes al momento de efectuar la filtración. Una vez finalizado el ensayo de aptitud se deberá realizar un análisis de riesgo o realizar nuevamente otro ensayo, toda vez que se cambie el proveedor de la membrana o cambie alguna especificación del fabricante.

4. Neutralización por cambio de diluyente:

El cambio de diluyente en los ensayos de aptitud de las técnicas de análisis microbiológico no se encuentra descrito en las farmacopeas y es recomendado para aquellos productos y/o materias primas, que al momento de la dilución o resuspensión en los diluyentes o medios de cultivo líquidos, producen variaciones de pH incompatibles con el desarrollo microbiano. Algunas farmacopeas recomiendan neutralizar el pH cuando éste está alejado de 7, pero cualquier microorganismo presente en la muestra al momento de la neutralización, frente a un pH diferente podría ver seriamente afectado su sistema metabólico y su capacidad de división. Por otro lado el agregado de bases o ácidos para llevar el pH cercano a 7 generará zonas de pH extremo al momento del goteo que posiblemente genere muerte celular. Por lo que el autor recomienda en estos casos usar un diluyente con mayor capacidad reguladora, como por ejemplo utilizar la misma solución reguladora de pH descrita en las farmacopeas para análisis microbiológico pero en mayor concentración ⁽²⁶⁾. Recordar que se debe comprobar siempre que la nueva formulación del diluyente no es tóxica, ni inhibe o afecta el crecimiento microbiano.

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

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

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

Tabla IV: Ensayo de sensibilidad ⁽²¹⁾

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

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

- ii. *Recuperación por filtración con membrana*: Cuando se evalúa una técnica de análisis por esta metodología se debe considerar la inoculación de las suspensiones de microorganismos en el último lavado luego de la filtración del producto a analizar, lo cual permitiría evaluar que no hay restos de antimicrobianos en la membrana. Nuevamente al igual que en la metodología de recuperación en medio sólido se deberán inocular no más de 100 UFC de los microorganismos en estudio. Es necesario considerar que la recuperación por filtración con membrana puede causar por sí misma una inhibición del crecimiento bacteriano por lo que los controles positivos de recuento deben hacerse por volcado en placa. Debe hacer notar que actualmente se está cuestionando el agregado de los microorganismos en el último lavado, y se está considerando inocularlos directamente en la solución de producto antes de filtrar.
- iii. *Recuperación en medio líquido*: Esta metodología se utiliza para el recuento por el método de número más probable (NMP) y para la investigación de microorganismos específicos. Al igual que los casos anteriores el inóculo no debe ser mayor a 100 UFC en los medios utilizados y se debe inocular las suspensiones de microorganismos una vez realizado el método de análisis. En este caso se debe considerar que el volumen del inóculo no debe superar el 1% del volumen del producto, ya que si el volumen es mayor se modificará tanto la concentración final del medio de cultivo, como del producto a evaluar y el ensayo no estaría representando la realidad.

Ensayo de aptitud del método de análisis:

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

Se procede entonces a realizar el análisis, inoculando las preparaciones de producto con los microorganismos a

evaluar (ver más arriba: Microorganismos a utilizar en la determinación de la aptitud del ensayo microbiológico) y comparando contra un control, sin la presencia del producto a evaluar, inoculado en las mismas condiciones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

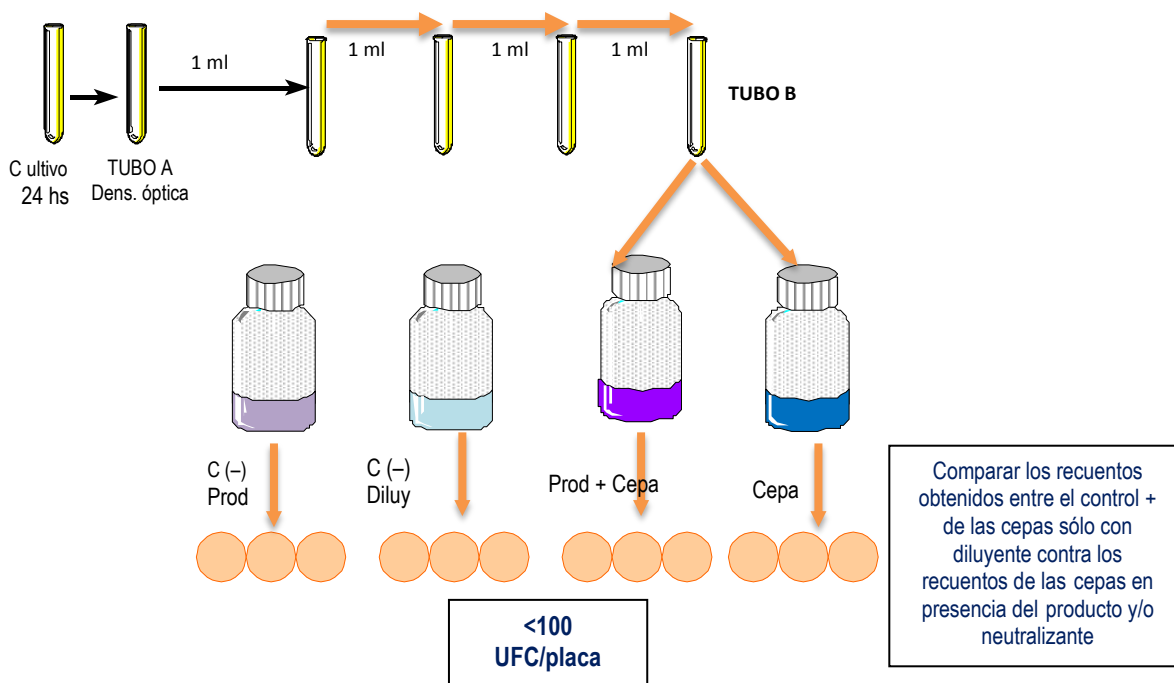


Figura 2. Esquema para el ensayo de aptitud: Métodos de recuento

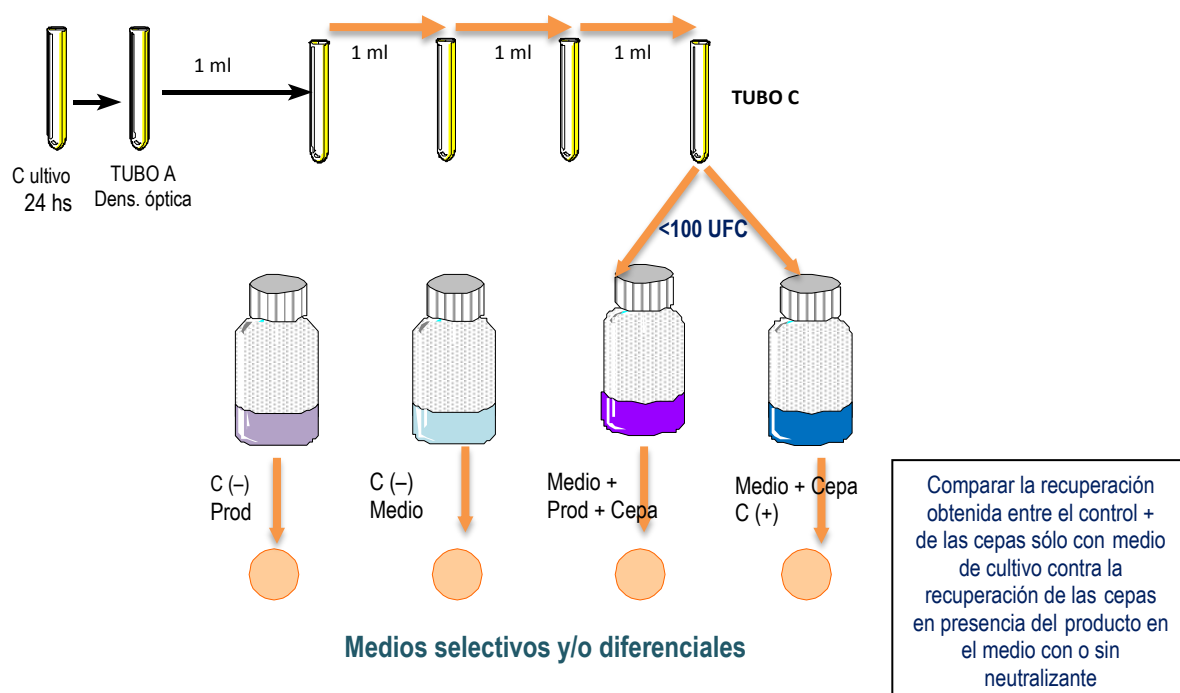


Figura 3. Esquema para el ensayo de aptitud: Microorganismos específicos

En los ensayos de aptitud de las técnicas para microorganismos específicos se podría considerar diferentes tiempos de incubación (mayores a 18 hs) o rangos (Ej.: 1 a 7 días) en la incubación de los medios de cultivo, para ser tenidos en cuenta durante fines de semana, feriados o problemas que pudieran surgir en el laboratorio que no permitan realizar los pasajes a medios diferenciales y/o selectivos en los tiempos establecidos en las farmacopeas. Ya que si un microorganismo es detectado a las 18- 24 hs de incubación, podría no ser detectado a tiempos mayores. Se muestra en la Tabla V un ejemplo ocurrido en nuestro laboratorio con un producto utilizando como cepa de análisis *Salmonella enterica* ATCC 14028 y TSB como medio de cultivo.

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

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

5. Cumplimiento del ensayo de aptitud de un método microbiológico

Para que un ensayo de aptitud se considere completo, al menos 3 réplicas independientes (considerando días diferentes, suspensiones microbianas independientes, en lo posible diferentes operadores, etc.) del método deben ser llevadas a cabo y en cada una se debe demostrar que la recuperación microbiana en presencia del producto es similar al control sin producto (ensayo de recuperación de microorganismos específicos y ensayo de

esterilidad) o que el promedio de las UFC recuperadas del inóculo del producto sea superior al 50% ^(4 y 9) o mayor al 70% ⁽⁷⁾ comparadas con las obtenidas en el inóculo del control sin producto (ensayo de recuento de productos no obligatoriamente estériles).

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

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

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

6. Protocolo de aptitud de un método microbiológico

El protocolo debe incluir al menos:

- Objetivo del ensayo
- Técnica a ensayar
- Condiciones del ensayo
- Microorganismos ensayados/ N° de repique
- Lotes de producto
- Lotes de Medios y/o diluyentes
- Criterios de aceptación
- Resultados
- Toxicidad
- Efectividad
- Observaciones
- Conclusiones
- Fecha - Analista – Responsable

Ensayo preliminar

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

Primero debemos considerar lo siguiente:

- ¿Tiene el producto el agregado de un agente antimicrobiano?
- ¿Conozco si el producto o su formulación (principio activo y/o excipientes) poseen propiedades antimicrobianas?
- ¿Conozco con anticipación cómo se comportarán los microorganismos frente a mi producto? (En general responder esta pregunta es muy difícil pero en el caso que tengamos ensayados productos con el mismo

principio activo o parecida formulación esto nos permitirá definir rápidamente la técnica a aplicar)

- ¿Qué propiedades químicas y físicas tiene el producto a ensayar?. Es importante poder evaluar:
 - Estructura
 - Solubilidad
 - pH en solución
 - Capacidad quelante

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

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

Tabla VI: Diluciones seriadas de la muestra

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

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

Tabla VII: Inoculación en tubos de dilución seriada de la muestra.

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

Es importante:

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

ANÁLISIS Y MANEJO DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO PRELIMINAR

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

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

Los resultados se vuelcan en tablas que permitirán evaluar el comportamiento de los diferentes microorganismos frente al producto. En las Tablas VIII, IX, X., XI y XII se muestran los posibles resultados que se pueden obtener al realizar un ensayo preliminar.

Tabla VIII. El producto no presenta inhibición del crecimiento microbiano

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

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

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

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

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

Tabla XI. El producto descrito en la tabla X que presentaba inhibición de dos cepas bacterianas deja de ser inhibitorio en diluciones intermedias, no analizadas en el primer ensayo preliminar.

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

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

Tabla XII. El producto en análisis presenta actividad inhibitoria en el desarrollo bacteriano, que no es neutralizada por dilución.

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

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

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

Aptitud de los ensayos de efectividad antimicrobiana

La aptitud de los métodos para determinar la efectividad antimicrobiana de formulaciones debe también ser demostrada. El ensayo de efectividad antimicrobiana consiste en desafiar el producto o la formulación a evaluar con un inóculo de diferentes microorganismos, hasta una concentración final de 1×10^5 - 1×10^6 UFC / ml ó g de la formulación a evaluar. Este inóculo no debe el 1% del volumen de la formulación en estudio. Una vez inoculadas las muestras se almacenan a 20-25° C y se determina el comportamiento de los microorganismos (crecimiento, muerte, bacteriostasis o alteración de propiedades del producto) a distintos tiempos. Estos tiempos varían según las farmacopeas vigentes, ya que aún no han sido armonizados. ^(3 y 35)

Los microorganismos a utilizar son:

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

La preparación de los inóculos es exactamente igual a la descrita anteriormente (Ver 4. Procedimiento, b) Preparación de los inóculos) con la diferencia que aquí se utilizarán los tubos de mayor concentración microbiana, mientras que las diluciones se utilizarán para efectuar los recuentos de los inóculos y así calcular el número de microorganismos inoculados en el producto.

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

Conclusiones

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

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

Bibliografía

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

27. *Desinfection, Sterilization, and Preservation* (4th edition) Seymour S. Block. Lea & Febiger (1991) Chapter 5: Kinetics of the inactivation of microorganisms.
28. FDA, 21 CFR 211, Volume 4 (2008)
29. *Does International Harmonization of the USP Microbial Limits Tests Require Re-Validation of Finished Product Tests?*. Scott Sutton, Microbiology Topics. Journal of Validation Technology (2009)
30. *Validation of Microbial Recovery from Disinfectants*. Scott Sutton et al. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Vol. 56, N°5 (2002)
31. *Adaptive Evolution That Requires Multiple Spontaneous Mutations*. Barry G. Hall. Genetics, vol 120, 887-897 (1988)
32. *Mutation in continuous cultures*. Kubitschek H. E. and Gustafson L. A. Journal of Bacteriology, vol 88 N° 6, 1595-1597 (1964)
33. *Selection in Chemostats*. Dykhuizen D. E. and Hartl D. L. Microbiology Reviews, 150-168 (1983)
34. *The apparent clock-like evolution of Escherichia coli in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics*. Wick L. M., Weilenmann H. and Egli T. Microbiology vol 148, 2889-2902 (2002)
35. Ph. Eur. Chapter 5.1.3 *Efficacy of Antimicrobial Preservation*

Valoraciones de antibióticos por métodos microbiológicos

Mirta Franco

- *Definición*
- *Cuándo usar un método microbiológico para cuantificar un antibiótico*
- *Propósito*
- *Determinación de la potencia (actividad) de un antibiótico por métodos microbiológicos*
- *Técnicas: Técnica en placas y Técnica en tubos*
- *Curva Dosis - Respuesta*
- *Elección del diseño experimental*
- *Descarte y reemplazo de datos aberrantes*
- *Test de validez*
- *Cálculo de la potencia y su intervalo de confianza*
- *Bibliografía*

Definición

Las valoraciones microbiológicas son un caso particular de valoración biológica. Como tal, consisten en cuantificar la potencia o actividad de una sustancia activa determinada comparando las concentraciones de una muestra y de una preparación patrón o de referencia que producen el mismo efecto, obteniéndose así una potencia relativa cuantitativa.

En el caso de las valoraciones microbiológicas de los antibióticos (antimicrobianos de uso clínico), la determinación de su potencia (actividad) se basa en la comparación cuantitativa de la inhibición del crecimiento de un microorganismo de ensayo en un medio adecuado, producida por al menos dos preparaciones, una de las cuales es el patrón. El microorganismo de ensayo debe ser susceptible al antibiótico a valorar y el medio de cultivo permitir un crecimiento rápido y abundante en ausencia del antibiótico.

Cuándo usar un método microbiológico para cuantificar un antibiótico

Las valoraciones por métodos microbiológicos están indicadas cuando así lo especifican las Farmacopeas o cuando es el único método aplicable, debido a la naturaleza química del antibiótico o a que la misma es desconocida. Dado que el método microbiológico determina la potencia (actividad) a través de la medición de la inhibición del crecimiento y no de propiedades físicas o estructuras químicas, no resulta indispensable conocer su composición. Si nos remontamos al descubrimiento de la penicilina por Fleming en el 1928, veremos que la actividad de la penicilina fue descubierta antes que se conociera su estructura química.

Por otra parte, muchos antibióticos pueden cuantificarse por otros métodos, físicos o químicos, pero aún en estos casos el método microbiológico puede constituir una alternativa de elección por su elevada sensibilidad y

especificidad y/o por las características del laboratorio analítico.

Las muestras que pueden ser analizadas por métodos microbiológicos incluyen sustancias activas puras y productos compuestos, ya sea medicamentos, muestras clínicas, extractos naturales, etc., constituidos por mezclas de sustancias relacionadas químicamente pero que difieren cuali y cuantitativamente en sus efectos biológicos o por mezclas de sustancias no relacionadas químicamente pero que tienen actividad biológica.

Propósito

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

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

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

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

1. Consulta bibliográfica (Farmacopeas)

- Preparaciones de referencia y unidades
- Técnicas sugeridas
- Microorganismos de ensayo y preparación de inóculos
- Medios de cultivo
- Diluyentes
- Rangos de concentraciones de las sustancias activas
- Temperaturas de incubación

2. Realización de la curva Dosis – Respuesta

- Rango de concentraciones del ensayo
- Transformaciones de datos para linealizar la respuesta

3. Elección del diseño experimental

- Examinar la validez del modelo matemático para calcular la potencia
- Estimar el intervalo de confianza de la potencia calculada

4. Ensayo microbiológico propiamente dicho

5. Descarte y reemplazo de datos aberrantes

6. Análisis de la validez del ensayo

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

Consulta bibliográfica.

La consulta bibliográfica previa es muy útil para conocer las especificaciones aplicables a los ensayos microbiológicos de antibióticos codificados, las que sirven de guía orientativa para la puesta a punto del ensayo. Dado que las diferentes Farmacopeas presentan información muy completa sobre características de los ensayos tales como preparaciones de referencia y unidades, microorganismos de ensayo y preparación de inóculos, diluyentes para la preparación de las soluciones del patrón y de las muestras, rangos de concentraciones sugeridos, medios de cultivo y temperaturas de incubación, nos remitiremos a esa información, que no será transcrita en este capítulo.

Preparaciones de referencia y unidades.

Dado que los ensayos microbiológicos de antibióticos se basan en la comparación de los efectos de una muestra y un patrón de referencia, la importancia de éste último es fundamental. Idealmente, un patrón de referencia debe ser estable, homogéneo, disponible en cantidades suficientes para un largo período y ser cualitativamente idéntico a la sustancia a ensayar.

Es necesario que la potencia de un antibiótico esté referida a un patrón común, por ello la OMS promueve el establecimiento de patrones biológicos internacionales para cubrir los requerimientos mundiales, los cuales surgen generalmente de estudios colaborativos entre varios países, y a los que se les asigna una potencia, preferentemente en unidades internacionales por miligramo, siendo definida la unidad de actividad biológica como la actividad específica contenida en un cierto peso. En muchos casos la unidad internacional es idéntica al microgramo equivalente.

Puesto que la cantidad disponible para su distribución es limitada, cada país debería establecer sus propios patrones nacionales, calibrándolos frente a los patrones internacionales. Para ensayos de rutina cada laboratorio necesita disponer de patrones de trabajo, cuya potencia debe ser determinada frente a patrones oficiales.

Cuando una sustancia puede ser caracterizada física y químicamente, no hay necesidad de un patrón biológico. Para estos casos la valoración microbiológica usa como patrón de referencia una sustancia de identidad y pureza conocidas, determinadas por medios físicos o químicos. Por ejemplo, para las penicilinas semisintéticas no son necesarios patrones biológicos. Una ventaja adicional de los patrones químicos es que están disponibles en grandes cantidades.

Preparación de las soluciones de patrones y muestras.

Como ya se mencionó, las formas químicas de las sustancias activas utilizables como patrones, así como la composición de los diluyentes para la preparación de soluciones concentradas y de trabajo, se especifican en las diferentes Farmacopeas. En general, los diluyentes son acuosos, lo que constituye una de las limitaciones de los ensayos microbiológicos, ya que sólo pueden aplicarse a sustancias activas solubles en agua.

Debido a la importancia que reviste la exacta concentración de las soluciones utilizadas como referencia, la preparación de las soluciones del patrón exige considerar cuidadosamente las pesadas y mediciones volumétricas.

El peso no debe ser demasiado pequeño ni demasiado grande. Una cantidad demasiado pequeña puede ser causa de un error significativo o, si el material no es homogéneo, de un error de muestreo. Una cantidad grande requerirá excesivas diluciones, con el consiguiente error adicional. Frecuentemente se requiere que la potencia de un antibiótico se exprese en términos de peso seco; en estos casos el secado del material en un horno es una fuente adicional de error.

Si la muestra en ensayo es la sustancia activa misma, el método de preparación de la muestra es generalmente idéntico al del patrón. Si la muestra es un producto farmacéutico compuesto, un material de origen clínico o un producto natural crudo o parcialmente purificado, puede ser necesario separar cuantitativamente la sustancia activa de otras sustancias que puedan interferir en el ensayo, ya sean activas o inertes. Estas últimas pueden modificar la respuesta por producir adsorción (fase sólida) o partición (fases líquidas) de la sustancia activa. La presencia de sales o de nutrientes en la muestra puede modificar la velocidad de difusión de los antibióticos en medios sólidos o la velocidad de crecimiento de los microorganismos, respectivamente. Además, muestras proteicas, como sangre o leche, pueden unir sustancias activas.

Microorganismos de ensayo y preparación de inóculos

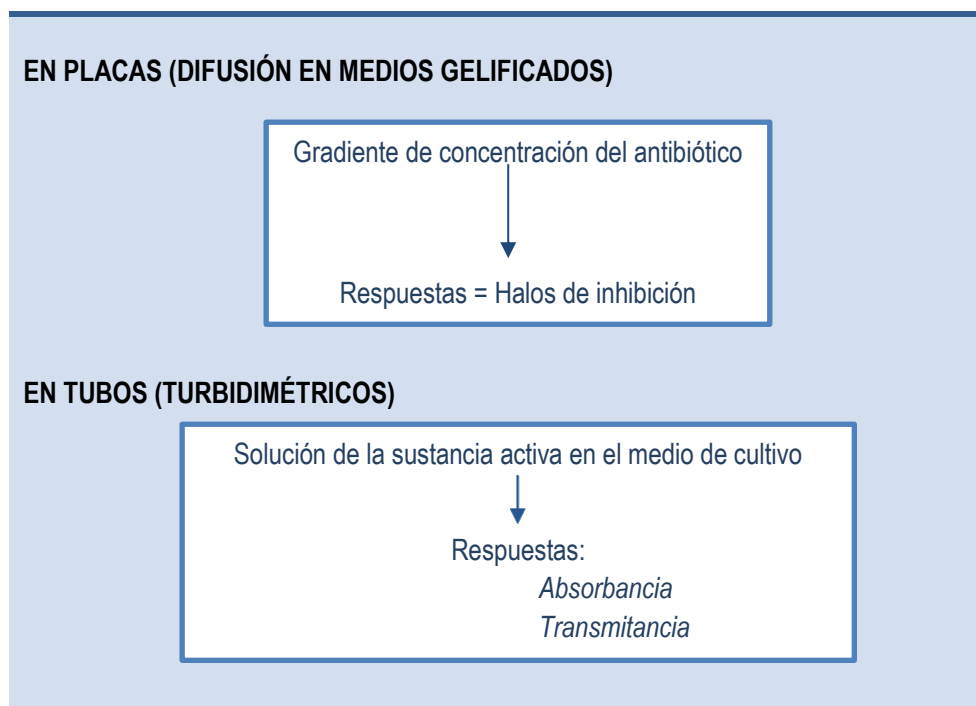
Los microorganismos de ensayo codificados en las Farmacopeas pueden ser bacterias u hongos, idealmente no patógenos. Su conservación debe realizarse de acuerdo a normas internacionales que aseguren su pureza, incluso genética. La manipulación de los microorganismos por parte de personal entrenado en microbiología debe hacerse respetando los criterios de asepsia y bioseguridad ya conocidos.

La estandarización de las suspensiones inóculo generalmente se realiza por mediciones de absorbancia, en el caso de células vegetativas, y por recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) cuando se trata de suspensiones de esporos. En un ensayo microbiológico lo que interesa es el número inicial de microorganismos viables, es decir con capacidad para reproducirse en las condiciones del ensayo. Si bien la estandarización de los inóculos por determinación de su absorbancia no es una medida de los microorganismos viables presentes, la preparación de ese inóculo en condiciones estandarizadas garantiza que la fracción de viabilidad en el inóculo sea aproximadamente constante y útil a los fines del ensayo. Aquí lo importante es que el número inicial de microorganismos viables sea el mismo en los sucesivos ensayos, más que conocer su valor numérico.

TÉCNICAS

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

Figura 2. Técnicas aplicables a los ensayos microbiológicos

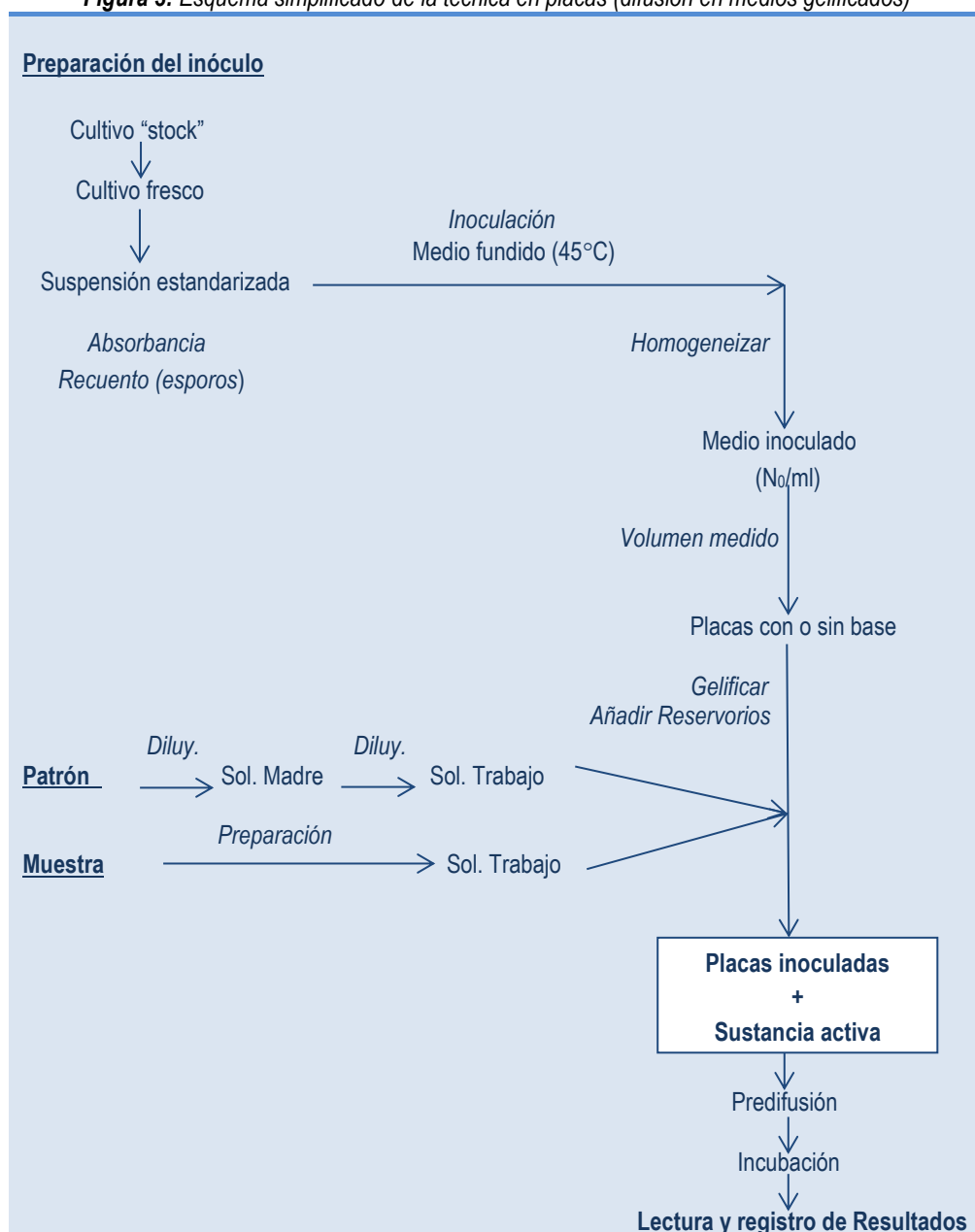


A continuación se describen los fundamentos y generalidades de cada técnica, dejando nuevamente claramente establecido que las especificaciones para los ensayos de cada antibiótico particular se encuentran codificadas en las Farmacopeas.

Técnica en placas

Brevemente, diremos que un volumen medido de una suspensión estandarizada del microorganismo de ensayo se inocula en el medio de cultivo adecuado, previamente fundido y enfriado a una temperatura compatible con la viabilidad microbiana (42°-45°C). Luego de homogeneizar el medio inoculado, por agitación, se vuelcan volúmenes medidos en placas de Petri que pueden contener o no una base de medio sin inocular ya gelificado. Una vez gelificado el medio inoculado, se insertan los reservorios para las soluciones de patrón y muestra. Estos reservorios pueden ser de diferente tipo: cilindros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro externo y 6mm de diámetro interno, aisladores de porcelana, papeles de filtro, o simplemente perforaciones circulares realizadas en el medio con un sacabocados. Luego, se colocan las soluciones de trabajo del patrón y las soluciones de la muestra en los reservorios, a razón de una en cada reservorio. La cantidad de reservorios por placa, de soluciones del patrón y de la muestra y la distribución de cada uno dependerán del diseño del ensayo microbiológico. Más adelante aclararemos este punto. Finalmente, las placas se llevan a incubar en las condiciones establecidas y, al finalizar el período de incubación se registra el tamaño de los halos de inhibición que se observan alrededor de cada reservorio. En la Figura 3 se muestra un esquema resumido de esta técnica.

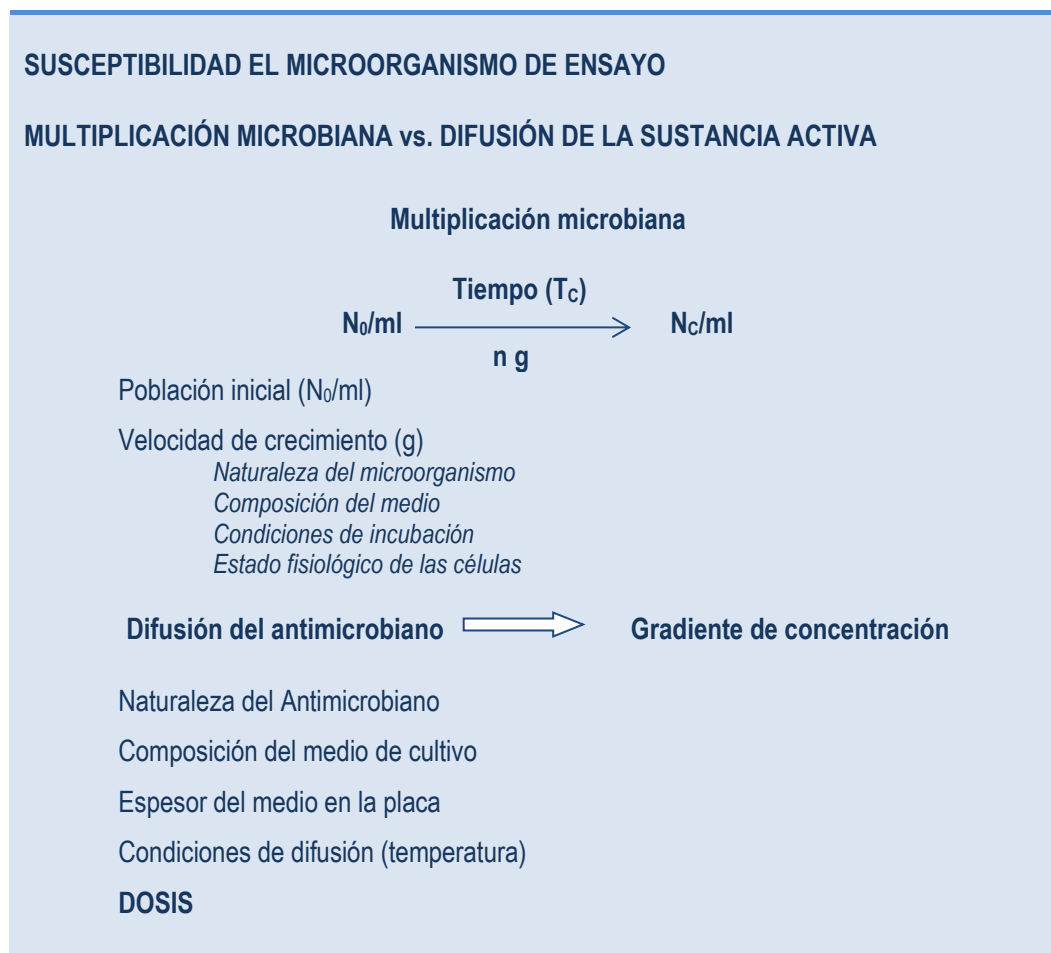
Figura 3: Esquema simplificado de la técnica en placas (difusión en medios gelificados)



Factores que modifican la magnitud de la respuesta:

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

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



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

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

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

Un razonamiento similar permite comprender que cuanto mayor sea la velocidad de crecimiento (menor g)

también será menor T_c y, consecuentemente, menor el halo de inhibición. Así todo parámetro que influya sobre la velocidad de crecimiento, como el tipo de microorganismo, el estado fisiológico de las células inoculadas, la composición cuali y cuantitativa del medio de cultivo y las condiciones de incubación, principalmente la temperatura, incidirán sobre el tamaño del halo de inhibición, de modo que a mayor velocidad de crecimiento menor halo de inhibición y viceversa.

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

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

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

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

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

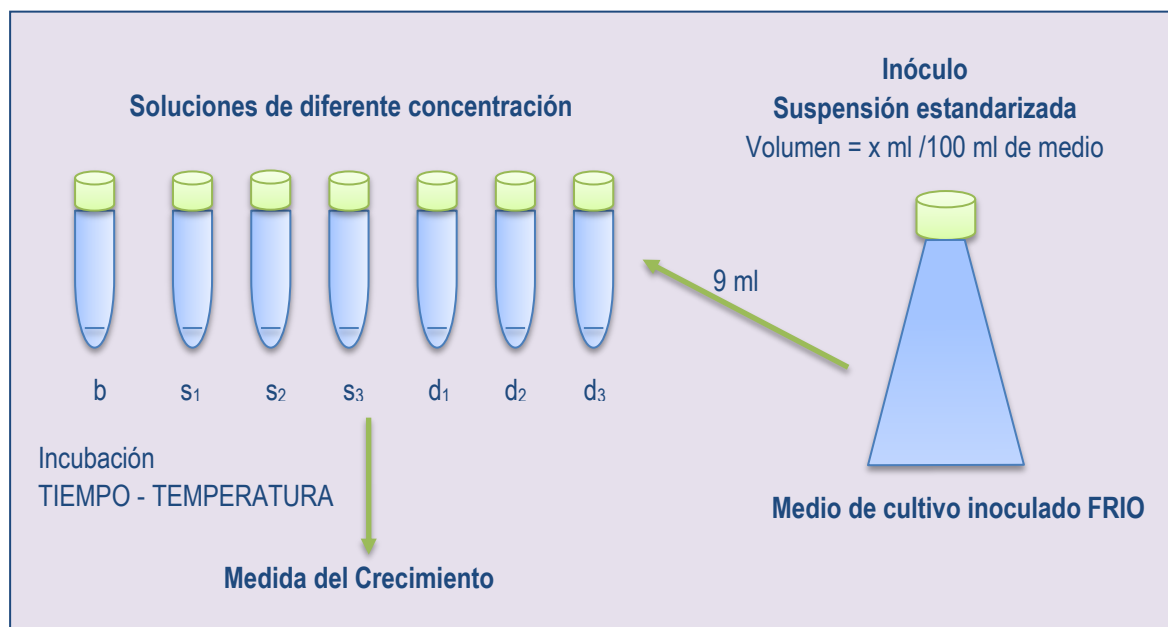
Más adelante veremos que los diseños en los que cada placa contiene todos los tratamientos, permiten minimizar el error.

Técnica en tubos

En los ensayos microbiológicos de antibióticos en tubos se preparan soluciones de la sustancia activa (patrón y muestra) en un medio de cultivo que, en ausencia de dicha sustancia, permite el crecimiento rápido del

microorganismo de ensayo. Para ello, una vez preparadas las soluciones de trabajo del patrón (s_1 , s_2 y s_3) y de la muestra (d_1 , d_2 y d_3), se coloca 1 ml de cada una de ellas si son acuosas y 0,1 ml si son en etanol, en series de tubos de ensayo, preferentemente estériles. Una serie que contiene el mismo volumen del diluyente corresponderá al blanco (b) o concentración 0, y servirá como control de crecimiento y para calcular ciertas transformaciones de las respuestas. En general, cada serie es de 4 tubos (cuadruplicado). A cada uno de los tubos se les agrega 9 ml del medio de cultivo inoculado con un volumen medido de una suspensión estandarizada del microorganismo de ensayo, se mezclan por agitación y se llevan a incubar en las condiciones establecidas para cada antibiótico. El tiempo de incubación es de alrededor de 4 horas, razón por la cual la diferencia de tiempo entre el agregado del medio inoculado al primero y al último tubo puede producir errores significativos. Por ello, dicho agregado se debe hacer al azar, sin un orden preestablecido. Una estrategia que produce buenos resultados es mantener el medio a ser inoculado a temperaturas de refrigeración hasta el momento de ser inoculado. De esta manera la velocidad de crecimiento de los microorganismos de ensayo será nula o muy reducida hasta el momento de llevarlos a incubar, y prácticamente todos los tubos alcanzarán la temperatura óptima de crecimiento al mismo tiempo. Se aconseja agregar un tubo adicional de s_1 y s_3 para ir observándolos durante la incubación y decidir el punto final; estos tubos no son considerados para el análisis de la respuesta. Cumplido el período de incubación, es necesario interrumpir el crecimiento microbiano, idealmente al mismo tiempo en todos los tubos o, de lo contrario, al azar. La interrupción del crecimiento se puede realizar sumergiendo los tubos a temperaturas de 80° C, cuyo principal inconveniente es que puede producir coagulación de proteínas y dificultar la lectura espectrofotométrica, o agregándoles a cada tubo un volumen fijo de una solución diluida de formol y mezclando inmediatamente. El tiempo de definición varía de acuerdo al sistema (antibiótico - microorganismo de ensayo) y a la densidad del inóculo. Finalmente, la respuesta cuantificable es una estimación del crecimiento del microorganismo de ensayo, generalmente absorbancia o transmitancia de los cultivos. Las lecturas se realizan contra un blanco de lectura que puede realizarse de diferentes maneras: usando medio de cultivo sin inocular, o inoculado, ya sea manteniéndolo refrigerado durante el período de incubación o al que se le agrega la solución de formol a tiempo 0 y se lo incuba en paralelo con el ensayo. Esta última alternativa es recomendable porque presentará la turbidez debida al inóculo, si la hubiera, y los eventuales cambios de color del medio producidos durante la incubación.

Figura 5. Ensayos microbiológicos de antibióticos en medios líquidos



Factores que modifican la magnitud de la respuesta

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

microorganismos y la velocidad de crecimiento de los mismos, a los que se agrega el tiempo de incubación.

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

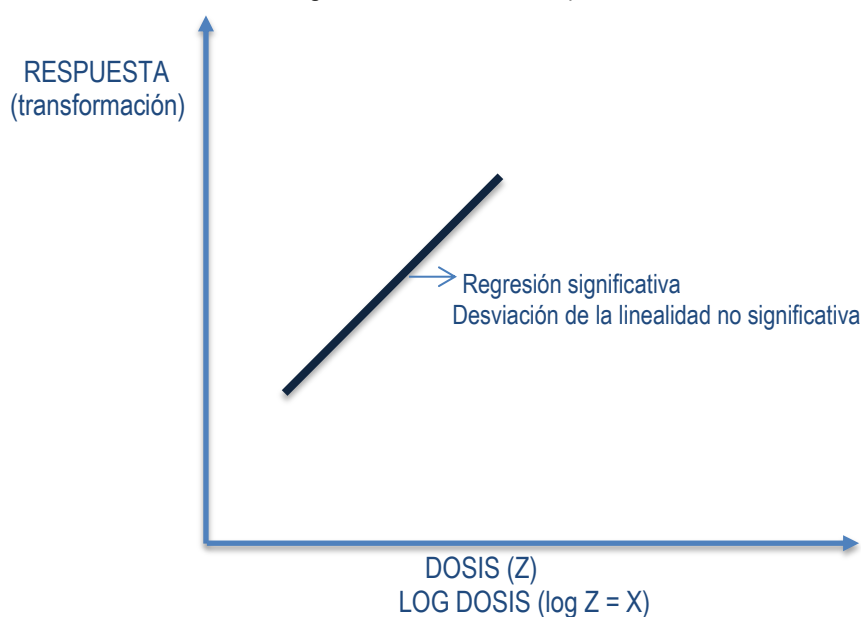
Tabla 1. Influencia de la temperatura y el tiempo sobre la población final de *E. coli*.

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

CURVA DOSIS – RESPUESTA

Previo al ensayo microbiológico de un antibiótico es necesario realizar una curva dosis – respuesta (D-R). La misma se realiza en las mismas condiciones en las que se va realizar el ensayo con la muestra pero, a diferencia de éste, se realiza con una sola preparación: el patrón de referencia. Usualmente se utiliza un mayor número de dosis de la sustancia activa, de modo de cubrir un rango más amplio de concentraciones que las que se van a usar en el ensayo propiamente dicho. El objetivo de esta curva es seleccionar un rango de concentraciones y la transformación de datos en los que la relación cuantitativa entre la dosis y la respuesta sea lineal (desviación de la linealidad no significativa) y muestre una regresión significativa, es decir que la variación de las dosis produzca variación de las respuestas.

Figura 6. Curva Dosis – Respuesta



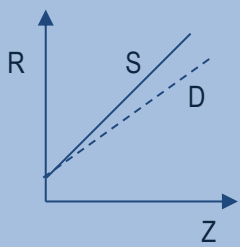
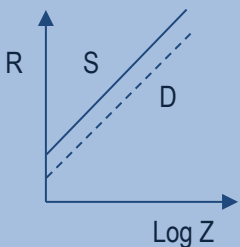
En la figura 6 se muestra un gráfico de las respuestas (o sus transformaciones) en función de la dosis o del logaritmo de la dosis y se observa un rango de dosis en el que se cumplen los requisitos de regresión y linealidad. Es conveniente destacar que las transformaciones de las respuestas surgen de aplicar operaciones matemáticas a las mismas, por ejemplo: elevar al cuadrado, calcular la inversa, etc., y no modifican el análisis posterior de los resultados.

Al final del capítulo se presenta el análisis estadístico de una curva Dosis – Respuesta con un número par de dosis en progresión geométrica.

El análisis estadístico de los ensayos microbiológicos de antibióticos será diferente según que la relación lineal de las respuestas se verifique con respecto a las dosis o al logaritmo de las dosis. En el primero de los casos los ensayos microbiológicos se realizarán y analizarán de acuerdo al modelo de relación de pendientes y en el segundo de acuerdo a rectas paralelas. Esto surge de las ecuaciones correspondientes a las respectivas rectas, como se muestra en la Figura 7.

Definida la potencia relativa “ ρ ” como la relación entre la dosis del patrón (Z_S) y de la muestra o desconocido (Z_D) que producen el mismo efecto, es posible reemplazar en las ecuaciones de las rectas el valor de Z_S por ρZ_D . Comparando las ecuaciones finales del desconocido con las ecuaciones de las rectas del patrón se verá que en el primer caso (relación lineal con la dosis) la ordenada al origen es la misma y las pendientes diferentes, mientras que en el segundo caso (relación lineal con el logaritmo de la dosis) las ordenadas al origen son diferentes y la pendiente es la misma. El primero constituye en ensayo de relación de pendientes y el segundo de rectas paralelas.

Figura 7. Ecuación de la recta

	
$\rho = \frac{Z_S}{Z_D} ; Z_S = \rho Z_D$	
$E(Y_S) = \alpha_S + \beta_S Z_S$ $E(Y_D) = \alpha_S + \underbrace{\beta_S \rho}_{\beta_D} Z_D$ $E(Y_D) = \alpha_S + \beta_D Z_D$ RELACIÓN DE PENDIENTES	$E(Y_S) = \alpha_S + \beta_S \log Z_S$ $E(Y_D) = \alpha_S + \beta_S \log \rho Z_D =$ $= \underbrace{\alpha_S + \beta_S \log \rho}_{\alpha_D} + \beta_S \log Z_D$ $E(Y_D) = \alpha_D + \beta_S \log Z_D$ RECTAS PARALELAS

ELECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

En un comienzo, los ensayos microbiológicos se realizaban según técnicas más o menos empíricas que arrojaban resultados poco confiables. A medida que se fueron conociendo los principios del ensayo y las fuentes de error, se desarrollaron diseños experimentales que permiten obtener resultados confiables.

El diseño experimental que se elija permitirá: i) verificar la validez del modelo matemático sobre el que se basa la ecuación de la potencia, para una probabilidad dada ($p=0,05$) y ii) calcular el error y estimar el intervalo de confianza de la potencia calculada, para una probabilidad dada.

La condición ideal sería que todas las unidades experimentales (reservorios o tubos) para cada dosis den la misma respuesta. En ese caso la dispersión es cero y el resultado del ensayo será el parámetro poblacional. Sin embargo, en la práctica se observa variación de respuestas para la misma dosis. La manera de controlar las variables es: i) hacer que influyan de la misma manera sobre TODAS las unidades experimentales, ii) contemplarlas o segregarlas en el diseño, por ejemplo en los diseños con separación en bloques, las variables que afectan a todas las unidades de un mismo bloque se eliminan en el análisis estadístico y iii) aleatorizar las variables.

Los diseños experimentales mayormente empleados en los ensayos microbiológicos de antibióticos son los diseños factoriales con separación en bloques (técnica en placas) o sin separación en bloques (técnica en tubos)

Los diseños factoriales tienen las siguientes características: relación de dosis constante y, en el caso de los diseños con separación en bloques, todos los tratamientos en cada placa. Si bien no son requisitos excluyentes, con el fin de facilitar el análisis estadístico, en este capítulo consideraremos sólo los diseños factoriales que además poseen igual número de dosis del patrón y de la muestra e igual número de respuestas por tratamiento.

El diseño factorial más simple que permite analizar todos los criterios de validez del ensayo: regresión, desviación del paralelismo y curvatura es el diseño 2×3 (ó $3 + 3$) para el que se usan 3 concentraciones del patrón y 3 concentraciones de la muestra. Otro diseño factorial que suele emplearse es el 2×2 (ó $2 + 2$), con la salvedad que no permite demostrar que no existe curvatura. El diseño que se basa en la interpolación de la respuesta de la muestra en la curva patrón ha ido siendo reemplazado por los diseños factoriales.

DESCARTE Y REEMPLAZO DE DATOS ABERRANTES

Los datos a descartar pueden obedecer a:

1. Fallas reconocidas durante la realización del ensayo
2. Posibles fallas descubiertas después de tabular las respuestas
 - 2.1. Atribuibles a irregularidades durante el ensayo
 - 2.2. Causa desconocida. En este caso se debe realizar el análisis de datos aberrantes para saber si corresponde descartarlos.

Cuando existen 2 o más tratamientos el criterio a seguir para el análisis de datos aberrantes es el siguiente:

- 1) Ordenar las respuestas de cada tratamiento en orden creciente o decreciente de magnitud.
- 2) Calcular el Rango (K) de cada tratamiento, como la diferencia entre la respuesta mayor y la respuesta menor
- 3) Calcular el valor de R, que resulta de dividir el mayor valor de K por la sumatoria de todos los K.
- 4) Comparar el valor de R obtenido con el valor crítico de R de tablas en las que k es el número de tratamientos y f es el número de respuestas por tratamiento.

Si el valor de R obtenido es mayor que el de tabla, el tratamiento es sospechoso de tener un valor aberrante. El paso siguiente es identificar la respuesta a descartar en aquel tratamiento que posee el mayor K. Una vez identificada se procede a descartarla y reemplazarla por un nuevo dato, calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{k T'_t + n T'_b - T'}{(k - 1)(n - 1)}$$

En ella k es el número de tratamientos, n es el número de bloques o placas, T'_t el total incompleto del tratamiento, T'_b el total incompleto del bloque y T' el total incompleto. Se entiende por totales incompletos las sumatorias de respuestas excluido el dato descartado.

Una vez reemplazado el dato descartado se procede nuevamente al análisis de datos aberrantes. Si el valor de R sigue siendo mayor al de la tabla, se sospecha que hay otro dato aberrante que deberá ser identificado de la misma manera que el anterior. Si el valor de R es menor que el de la tabla se procede al análisis de los resultados que correspondiere según el diseño, considerando el valor reemplazado, que resultará en la pérdida de un grado de libertad.

La posibilidad de descartar y reemplazar datos es limitada y, según la USP, puede variar entre 1 respuesta cada 25 a 50 respuestas.

TESTS DE VALIDEZ

Tienen por objeto determinar si un ensayo microbiológico es válido, es decir si las respuestas obtenidas pueden utilizarse para calcular la potencia del antibiótico en ensayo y el intervalo de confianza de dicha potencia. En los ensayos microbiológicos con 3 niveles de dosis para cada una de las preparaciones (patrón y muestras), las fuentes de variación a analizar son: preparaciones, regresión, desviación del paralelismo, curvaturas (combinada y opuesta) y bloques, cuando el diseño incluye bloques. Las fórmulas para calcular las sumas de cuadrados correspondientes a cada fuente de variación y la tabla del análisis de la varianza para los diseños factoriales 2 x 3 con y sin separación en bloques se presentan al final de este capítulo. En ambos casos los criterios de validez son los siguientes:

Regresión:	SIGNIFICATIVA (p < 0,05)
	MUY SIGNIFICATIVA (p < 0,01)
Desviación del paralelismo:	NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)
Curvatura combinada:	NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)
Curvatura opuesta:	NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA (p > 0,05)

CÁLCULO DE LA POTENCIA Y SU INTERVALO DE CONFIANZA

Si un ensayo microbiológico cumple los criterios de validez enunciados en el punto anterior, se procede a calcular la potencia de la muestra, que no será un valor puntual sino que incluirá su intervalo de confianza, para una probabilidad dada. El cálculo de la potencia puede hacerse analíticamente o gráficamente, para los diseños factoriales 2 x 3 con y sin separación en bloques, las fórmulas son las siguientes.

Cálculo de la potencia

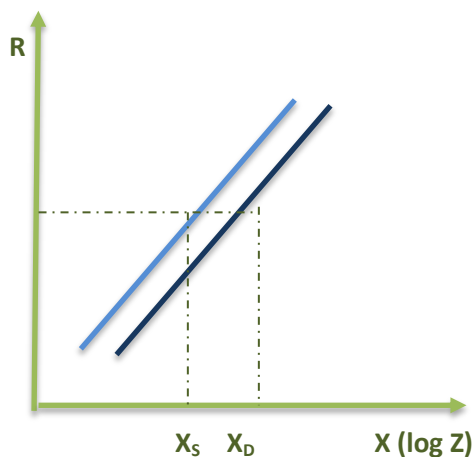
Símbolos

- M = logaritmo de la relación de potencias
- $\overline{y}_D$ = media de las respuestas del desconocido
- $\overline{y}_S$ = media de las respuestas del patrón
- b = pendiente común
- I = logaritmo de la relación de dos dosis sucesivas
- R = relación de potencias

Cálculo:

Cálculo gráfico

$$M_D = x_S - x_D$$



Cálculo analítico

$$M_D = \frac{\bar{Y}_D - \bar{Y}_S}{b}$$

$$\bar{Y}_D = \frac{(D_1 + D_2 + D_3)}{3n}$$

$$\bar{Y}_S = \frac{(S_1 + S_2 + S_3)}{3n}$$

Donde:

S_1 : Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.

S_2 : Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.

S_3 : Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.

D_1 : Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido

D_2 : Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido

D_3 : Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido

$$b = \frac{L_S + L_D + L_{D'} + \dots + L_{D''}}{2 \ln h}$$

$$I = \log S_2 - \log S_1$$

$$L_S = S_3 - S_1 \quad ; \quad L_D = D_3 - D_1$$

$$R_D = \text{antilog } M_D$$

POTENCIA CALCULADA de D = R_D x Potencia supuesta de D

La potencia supuesta se define como la potencia que tendría la muestra para que las soluciones de trabajo del patrón y de la muestra fueran idénticas:

$$\text{Potencia supuesta} = \frac{\text{Peso patrón} \times \text{Potencia patrón} \times \text{Dilución desconocido}}{\text{Dilución patrón} \times \text{Peso (vol) desconocido}}$$

La potencia calculada deberá coincidir con las especificaciones establecidas en la monografía correspondiente. Si no fuera así, el producto en análisis deberá ser rechazado.

Cálculo del intervalo de confianza de la potencia

$$\begin{matrix} M_S \\ M_I \end{matrix} \left\langle CM \pm \sqrt{(C-1)(CM^2 + c'/2)}\right.$$

$$c' = \frac{4}{3} h \quad \text{donde: } c' \text{ es una constante que depende del esquema de dosis,}$$

$$h = n^\circ \text{ de preparaciones}$$

$$C = \frac{E}{E - s^2 t^2} \quad \text{donde: } E = \text{SC regresión}$$

$$s^2 = \text{CM error}$$

$$t_{\text{error; 0,975}} = \text{valor de tabla}$$

$$R_S = \text{antilog } M_S$$

$$R_I = \text{antilog } M_I$$

$$P_S (\text{límite superior}) = R_S \times \text{Potencia supuesta}$$

$$P_I (\text{límite inferior}) = R_I \times \text{Potencia supuesta}$$

$$\% S = \frac{P_S - P}{P} \times 100$$

$$\% I = \frac{P - P_1}{P} \times 100$$

Hay una confianza del 95% de que la potencia del desconocido esté entre P_S y P_I . Si el intervalo de confianza excede los límites establecidos en la monografía correspondiente, significa que el ensayo no tiene la precisión adecuada. En ese caso, no corresponde informar la potencia calculada sino repetir el ensayo con mayor número de unidades (placas o tubos) para aumentar la precisión. Si se realiza más de un ensayo, y resultan homogéneos, es decir hay una importante superposición de los intervalos de confianza, la combinación de esos ensayos independientes generalmente resulta en un intervalo de confianza menor que el del ensayo más preciso.

Como conclusión, podemos decir que para informar la potencia de una muestra de un antibiótico, obtenida a partir de un ensayo microbiológico se deben cumplir:

- ◆ El ensayo debe cumplir con los criterios de validez
- ◆ El intervalo de confianza de la potencia debe estar dentro de los límites establecidos en la monografía correspondiente.

APÉNDICE

TESTS DE VALIDEZ

Curva dosis respuesta

d = número de dosis

S_i = sumatoria de las respuestas a cada dosis

G = Sumatoria de todas las respuestas

n = número de respuestas a cada dosis o tratamiento = número de placas

N = número total de respuestas

R_i = sumatoria de las respuestas en cada placa

C = coeficiente lineal (varían según se trate de números de dosis pares o impares)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

1.- REGRESIÓN

$$SC \text{ regresión} = \frac{(\sum_i C_i S_i)^2}{n \sum C_i^2}$$

2.- DESVIACIÓN DE LA LINEALIDAD

$$SC \text{ desviación de la linealidad} = SC \text{ tratamientos} - SC \text{ regresión}$$

$$SC \text{ tratamientos} = \frac{S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_d^2}{n} - \frac{G^2}{N}$$

3.- BLOQUES

$$SC \text{ bloques} = \frac{R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2}{d} - \frac{G^2}{N}$$

4.- TOTAL

$$SC \text{ total} = \sum Y^2 - \frac{G^2}{N}$$

5.- ERROR

$$SC \text{ error} = SC \text{ total} - SC \text{ tratamientos} - SC \text{ bloques}$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM _{error})	p
Regresión Desv. Linealidad	1 d - 2				< 0,01 > 0,05
Tratamientos Bloques Error	d - 1 n - 1 (d - 1) (n - 1)				
Total	N - 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA (F calculado > F de tabla)

Desviación de la linealidad: NO SIGNIFICATIVA (F calculado < F de tabla)

Ensayo microbiológico en placas (Difusión en medios gelificados)

Diseño factorial 3 + 3 con separación en bloques

Características del diseño

Log dosis equiespaciados (relación de dosis constante)

$$s_2/s_1 = s_3/s_2 = d_2/d_1 = d_3/d_2$$

Igual número de respuestas para cada tratamiento

Todos los tratamientos en cada placa

3 + 3 tratamientos

3 dosis del patrón (s_1 , s_2 , s_3)

3 dosis de cada desconocido (d_1 , d_2 , d_3 , etc.)

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

SÍMBOLOS:

S_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.
S_2	Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.
S_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.
D_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido
D_2	Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido
D_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido
S	$S_1 + S_2 + S_3$
D	$D_1 + D_2 + D_3$
G	Suma de todas las respuestas
n	Número de placas = Número de respuestas a cada tratamiento
N	Número total de respuestas
R_1	Suma de todas las respuestas de la placa 1
R_2	Suma de todas las respuestas de la placa 2
R_3	Suma de todas las respuestas de la placa 3
R_n	Suma de todas las respuestas de la placa n

1.- PREPARACIONES. No es exactamente un criterio de validez. Pretende investigar si la potencia supuesta estuvo bien supuesta.

$$SC \text{ preparaciones} = [(S_1 + S_2 + S_3) - (D_1 + D_2 + D_3)]^2 / 6n$$

2.- REGRESIÓN. La suma de cuadrados de la regresión refleja la **regresión común**, por ello siempre es un contraste. Pretende reflejar si hay una relación dosis-respuesta real (si no se está trabajando en el "plateau" de la curva).

$$SC \text{ regresión} = [(S_3 - S_1) + (D_3 - D_1)]^2 / 4n = E$$

3.- DESVIACIÓN DEL PARALELISMO. Es un criterio de validez fundamental que refleja la condición de similitud entre patrón y desconocido. Es un contraste cuando hay dos preparaciones. Sin embargo cuando hay más de dos preparaciones no es un contraste porque se comparan tantas regresiones como preparaciones hay.

$$SC \text{ desviación del paralelismo} = [(S_3 - S_1) - (D_3 - D_1)]^2 / 4n$$

4.- CURVATURA COMBINADA. Es una curvatura común o promedio de patrón y desconocido. No debe haber curvatura, los tres puntos deben estar alineados. Es un contraste. Cuando hay dos preparaciones, un paréntesis refleja la curvatura del patrón y otro la del desconocido. Cuando los tres puntos de cada preparación están alineados, cada paréntesis es cero

$$SC \text{ curvatura combinada} = [(S_1 - 2S_2 + S_3) + (D_1 - 2D_2 + D_3)]^2 / 12n$$

5.- CURVATURA OPUESTA. Refleja si las curvaturas del patrón y del desconocido son opuestas o en la misma dirección pero de distinto grado. Puede no haber curvatura combinada por compensarse las de diferente signo y sí haber curvatura opuesta. Se desea que ninguna de las dos sea significativa. Es un contraste cuando hay dos preparaciones. Si hay más de dos preparaciones no es un contraste y los grados de libertad son el número de preparaciones menos 1.

$$SC_{\text{curvatura opuesta}} = (S_1 - 2S_2 + S_3) - (D_1 - 2D_2 + D_3) \bigg/ 12n$$

6.- TRATAMIENTOS. Cada dosis de cada preparación es un tratamiento. No es un contraste, se comparan tantos términos como tratamientos hay (totales o medias). No es necesario como test de validez. Se usa como control de cuentas.

$$SC_{\text{tratamientos}} = (S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + D_1^2 + D_2^2 + D_3^2) / n - G^2 / N$$

7.- BLOQUES. No es un contraste. La SC entre bloques es independiente de la SC entre tratamientos. No incide sobre la potencia calculada. Permite eliminar la variabilidad debida a los bloques del error total, que tiene que ver con la precisión, es decir disminuye la amplitud del intervalo de confianza. Una variación excesiva puede indicar que la metodología no está puesta a punto.

$$SC_{\text{bloques}} = (R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2) / 6 - G^2 / N$$

8.- TOTAL. Refleja la variabilidad total entre todas las respuestas. Es el camino más simple para calcular la SC del error.

$$SC_{\text{total}} = \sum Y^2 - G^2 / N$$

9.- ERROR. Mide la variabilidad debida a causas no controladas en la experiencia.

$$SC_{\text{error}} = SC_{\text{total}} - SC_{\text{tratamientos}} - SC_{\text{bloques}}$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM _{error})	p
Preparaciones	1				
Regresión	1				< 0,01
Desv. Paralelismo	1				> 0,05
Alternativa 1:					
Curv. combinada	1				> 0,05
Curv. opuesta	1				> 0,05
Alternativa 2:					
Curvatura	2				> 0,05
Tratamientos	6 - 1				
Bloques	n - 1				
Error	N - n - 5				
Total	N - 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA ($p < 0,05$)
MUY SIGNIFICATIVA ($p < 0,01$)

Desviación del paralelismo: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura combinada: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura opuesta: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Medio líquido

Factorial 3 + 3 totalmente aleatorizado

Características del diseño

Igual número de dosis de cada preparación

3 dosis del patrón (s_1, s_2, s_3)
3 dosis de cada desconocido (d_1, d_2, d_3 , etc.)

log dosis equiespaciados (relación de dosis constante)

$$s_2/s_1 = s_3/s_2 = d_2/d_1 = d_3/d_2$$

Igual número de respuestas para cada tratamiento

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

SÍMBOLOS

S_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del patrón.
S_2	Suma de las respuestas a la dosis media del patrón.
S_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del patrón.
D_1	Suma de las respuestas a la dosis menor del desconocido 1
D_2	Suma de las respuestas a la dosis media del desconocido 1
D_3	Suma de las respuestas a la dosis mayor del desconocido 1
S	$S_1 + S_2 + S_3$
D	$D_1 + D_2 + D_3$
G	Suma de todas las respuestas
n	Número de respuestas a cada tratamiento
N	Número total de respuestas

TESTS DE VALIDEZ

1.- PREPARACIONES.

$$SC_{preparaciones} = [(S_1 + S_2 + S_3) - (D_1 + D_2 + D_3)]^2 / 6n$$

2.- REGRESIÓN.

$$SC_{regresión} = [(S_3 - S_1) + (D_3 - D_1)]^2 / 4n = E$$

3.- DESVIACIÓN DEL PARALELISMO.

$$SC_{desviación\ del\ paralelismo} = [(S_3 - S_1) - (D_3 - D_1)]^2 / 4n$$

4.- CURVATURA COMBINADA

$$SC_{curvatura\ combinada} = [(S_1 - 2S_2 + S_3) + (D_1 - 2D_2 + D_3)]^2 / 12n$$

5.- CURVATURA OPUESTA.

$$SC_{curvatura\ opuesta} = [(S_1 - 2S_2 + S_3) - (D_1 - 2D_2 + D_3)]^2 / 12n$$

6.- TRATAMIENTOS.

$$SC_{tratamientos} = (S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + D_1^2 + D_2^2 + D_3^2) / n - G^2 / N$$

7.- TOTAL.

$$SC_{total} = \sum Y^2 - G^2 / N$$

8.- ERROR.

$$SC_{error} = SC_{total} - SC_{tratamientos}$$

Tabla de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM) (SC/gl)	F (CM/CM _{error})	p
Preparaciones	1				
Regresión	1				< 0,01
Desv. Paralelismo	1				> 0,05
Alternativa 1:					
Curv. combinada	1				> 0,05
Curv. opuesta	1				> 0,05
Alternativa 2:					
Curvatura	2				> 0,05
Tratamientos	6 - 1				
Error	N - 1 - 5				
Total	N - 1				

CRITERIOS DE VALIDEZ

Regresión: SIGNIFICATIVA ($p < 0,05$)
MUY SIGNIFICATIVA ($p < 0,01$)

Desviación del paralelismo: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura combinada: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Curvatura opuesta: NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$)

Alternativamente, se puede considerar Curvatura (combinada + opuesta), la cual debe ser NO SIGNIFICATIVA ($p > 0,05$).

Bibliografía recomendada

USP <81> *Antibiotics – Microbial assay*

Farmacopea Europea 2.7.2. *Microbiological assay of antibiotics*

Hewitt, W. *“Microbiological Assay - An Introduction to Quantitative Principles and Evaluation”* - Academic Press, 1977

Hewitt, W. and Vincent, S.: *“Theory and application of microbiological assay”*. Academic Press, 1989

Hewitt, W.: *“Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: a Rational Approach”*. Llandysul, UK, CRC Press; 2003:1-260.

Kavanagh, F. *Analytical Microbiology* (1963)

Kavanagh, F. *Analytical Microbiology*. Volumen II (1972)

Valoración microbiológica de Vitaminas

Graciela Torno

- *Introducción*
- *Equipos utilizados*
- *Material utilizado*
- *Preparación de medios, estándar, inóculo y muestras*
- *Procedimiento del ensayo*
- *Curva dosis-respuesta*
- *Validación del método de valoración microbiológica*

Introducción

Este método utiliza la propiedad que tienen ciertos microorganismos de multiplicarse en presencia de una determinada vitamina y no multiplicarse en su ausencia. El tiempo de incubación y la composición del medio de cultivo utilizado es tal que la cantidad de vitamina en los tubos es el único factor limitante. Bajo estas condiciones, el total de masa microbiana es proporcional a la cantidad de vitamina en el tubo.

Los ensayos microbiológicos cuantitativos son métodos relativos y no absolutos. La respuesta de un microorganismo en una muestra es comparada con la respuesta del mismo microorganismo en las mismas condiciones con un estándar de concentración conocida.

Se utilizan métodos microbiológicos en lugar de utilizar métodos químicos para la determinación de la potencia de algunas vitaminas cuando el contenido de la misma en la muestra es muy bajo. Además los métodos químicos no tienen en cuenta la actividad biológica de los compuestos. Por ejemplo las formas *d* y *l* de una sustancia pueden ser indistinguibles para el método químico a pesar de que sólo uno de estos enantiómeros puede ser activo. Esto es detectado por el método microbiológico.

Equipos utilizados

- Autoclave
- Heladera
- Tanque criogénico (opcional para mantener el cepario)
- Baño termostático con circulación de agua, con una diferencia de temperatura máxima entre puntos de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- Balanza de precisión (pesadas de estándar y en algunos casos de muestras)
- Baño de ultrasonido
- Dilutor
- Baño de agua a 100°
- Micropipeta
- Vortex
- Espectrofotómetro

Todos los equipos GMP relevantes deben encontrarse calificados y calibrados antes de ser utilizados.

Material utilizado en general

Dentro del material general, se utilizan matraces, pipetas aforadas y graduadas, vasos de precipitados, frascos para contener el agua destilada para diluir, etc.

El material debe estar totalmente separado del material utilizado en las tareas habituales del laboratorio. Se debe tener presente que las cantidades de vitamina que se detectan mediante este método son tan bajas que cualquier contaminación con otro medio que contenga estas vitaminas invalidaría el ensayo.

El material, luego de ser utilizado, se enjuaga y es sumergido en una solución de detergente Extran alcalino 3% (preparada con agua purificada) por un tiempo aproximado de 10 horas. A continuación se enjuaga primeramente con agua potable y luego con agua purificada. Se seca y se guarda.

Preparación de medios, estándar, inóculo y muestra

- Aqua a utilizar:

Se utiliza agua destilada, la cual puede almacenarse en envases de vidrio que hayan recibido el mismo tratamiento que el material en general.

- Soluciones utilizadas en el momento de la preparación de la muestra:

En la Tabla 1 se indican las soluciones comúnmente utilizadas, pero también pueden ser necesarios agregados de HONa 0.01N, NH₃ 2%, HCl 4N, HOK 1N, metanol y/o acetona o algún emulsificante como el Tween 80.

Tabla 1: Soluciones, medios de cultivo y microorganismos

	Biotina	Vitamina B ₁₂	Ácido fólico
Soluciones utilizadas en el momento de la preparación de la muestra (extracción de la vitamina)	<i>Solución de tiosulfato de sodio:</i> S₂O₃Na₂·5H₂O: 5g H₂O destilada: 1000ml	<i>Buffer pH 5.3</i> PO₄HNa₂·2H₂O 20 g Ácido cítrico 10 g S₂O₅Na₂ 1 g H₂O destilada: 1000 ml	<i>Buffer pH 8.3</i> PO₄H₂K 1.3 g PO₄HK₂ 50 g H₂O destilada 1000 ml
Medios de cultivo	Biotin Assay Medium BD art. 24191 3.75g/ 100 ml	B12 Assay Medium BD art. 245710 4.25g/ 100 ml	Folic AOAC Medium BD art. 212169 5.5g / 100 ml
Microorganismos utilizados	<i>Lactobacillus planctarum</i> (arabinosus) ATCC 8014	<i>Lactobacillus leichmanii</i> ATCC7830	<i>Streptococcus faecium</i> ATCC 8043

- Microorganismos (Mantenimiento de cepas y preparación de inóculo)

A - Mantenimiento de cepas

Hay diversas formas de mantenimiento de estas cepas. En cualquiera de ellas se utilizan los siguientes medios de cultivo: M.A.C.A. (Micro Assay Culture Agar), Lactobacilli Broth y Tomato juice agar.

- 1- Una forma de mantenimiento de estas cepas es en refrigerador (2 °C a 8 °C) en agar MACA en forma de punción, realizando pasajes semanales. Recordar que no debe realizarse más de 5

pasajes desde la cepa de origen

- 2- Otra forma es mantenerlas en nitrógeno líquido. De esta manera se prepara la cantidad de inóculo que se utilizará en dos años, se fracciona en crioviales y se guarda en el interior de un tanque criogénico (aproximadamente menos 193 °C).

Si se parte de un cultivo ATCC (liofilizado), el contenido se resuspende en aproximadamente 2 ml de Lactobacilli Broth y de allí se realiza un repique por punción en M.A.C.A. Se incuba a 37°C durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se realiza un nuevo repique desde M.A.C.A a 300 ml de Lactobacilli Broth. Se incuba aproximadamente 6 horas para *Streptococcus faecium* y 12 horas para *Lactobacillus leichmanii* y *Lactobacillus planctarum* a 37°C. Al cabo de esta incubación se observará un crecimiento abundante en el medio de cultivo.

Se realizan 3 lavados con medio de cultivo correspondiente a la valoración a realizar (ejemplo: si se está preparando para su mantenimiento *Lactobacillus arabinosus*, se lavará el inóculo con Biotin Assay Medium). El medio se prepara según indicación del proveedor y lleva agregado de 15% de glicerina (como crioprotector). Luego del último lavado se deja el inóculo resuspendido en aprox. 200 ml del medio. Se fracciona, colocando 1.5 ml por criovial, y se coloca en el tanque criogénico, u otro método adecuado de conservación.

B- Preparación del inóculo

Para el primer caso de mantenimiento de cepas que se ha nombrado, es decir el cultivo mantenido en medio M.A.C.A en refrigerador, se realiza un repique en Lactobacilli Broth, se incuba el tiempo correspondiente (6 horas o 12 horas), se centrifuga a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante, y se realizan 2 lavados con solución fisiológica. Finalmente se toman 1.5 ml de esta suspensión, se agregan a 300 ml de solución fisiológica y con 0.5 ml de esta última se inocularán los tubos del ensayo.

En caso de partir del microorganismo mantenido en tanque criogénico, se toma el contenido de un criovial y se coloca en 300 ml de solución fisiológica, se agita y con 0.5 ml de esta suspensión se inocularán los tubos del ensayo.

- Preparación del estándar

Se prepara la solución estándar (solución madre) a partir de un estándar USP u otro estándar (por ejemplo secundario), exactamente pesados. La solución madre, puede ser guardada durante tres meses, a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y resguardada de la luz.

A continuación se expresan las concentraciones sugeridas de las soluciones madre de biotina, vitamina B12 y ácido fólico:

-Solución madre estándar de biotina: 0.12 mg de D(+) biotina/ ml solución

Ejemplo: pesar aproximadamente 24 mg de estándar de referencia de biotina, exactamente pesados en una cantidad de agua conteniendo 1 ml de solución NH₃ 2%, agregar 100 ml de etanol y llevar a 200 ml con agua destilada

-Solución madre estándar de vitamina B₁₂: 2.45 µg de cianocobalamina/ ml

Ejemplo: Pesar aproximadamente 490 µg de estándar de referencia de cianocobalamina exactamente pesados (generalmente los estándares USP de referencia tienen una potencia tal que para obtener esta cantidad de microgramos, la pesada a realizar es de una cantidad de mg) en 30 ml de agua. Agregar 100 ml de etanol y llevar a 200 ml con agua destilada

-Solución estándar de ácido fólico: 96 µg de ácido fólico/ ml

Ejemplo: Pesar aproximadamente 24 mg de estándar de referencia de ácido fólico anhidro, exactamente pesados. Disolver en 50 ml de HONa 0.01N y llevar a volumen de 250 ml con buffer pH 8.3

- Preparación de la muestra

En algunos casos las muestras sólidas deben ser molidas y con ayuda de agua destilada, formar una suspensión para poder ser trasvasadas al correspondiente matraz. En general se tratan las mismas con las soluciones nombradas en el punto “Soluciones, medios de cultivo y microorganismos”. Realizar diluciones de tal manera que la concentración de la última solución debe ser similar a la concentración de la última solución de estándar.

Procedimiento del ensayo

Elaborar el protocolo del ensayo asociado a la vitamina a determinar y al producto a analizar, documentando las diluciones de estándar (St) y muestra a realizar.

Para la valoración de vitamina, se utiliza el diseño de rectas paralelas. Para ello se utilizan tres dosis por triplicado, las cuales deben mantener una relación constante entre ellas. Por ejemplo se podrían cargar los tubos de ensayo con 200 µl, 400 µl y 800 µl de la última solución de estándar y de muestra. A continuación se expresa como sería la carga de tubos de ensayo para una valoración.

- Dos tubos de ensayo conteniendo sólo medio de cultivo (blanco)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis baja de estándar (St bajo)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis media de estándar (St medio)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis alta de estándar (St alto)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis baja de muestra (Muestra bajo)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis media de muestra (Muestra medio)
- Tres tubos de ensayo conteniendo la dosis alta de muestra (Muestra alto)
- Dos tubos de ensayo conteniendo sólo medio de cultivo (se utilizará como blanco inoculado)

Cada tubo (con excepción de los blancos) serán cargados con estándar y muestra y llevados a volumen final de 10 ml con medio de cultivo. Luego esterilizar por autoclave a 121°C, entre 5 y 10 minutos dependiendo de la vitamina que se está valorando (ver Tabla 1).

Enfriar a temperatura ambiente e inocular con 0.5 ml del inóculo preparado en la sesión “Preparación del inóculo”. Inocular los tubos que contienen estándar, muestra y los dos tubos con medio marcados como blancos inoculados.

Incubar de 16 a 26 horas y entre 30°C y 40°C. Es importante que una vez definida la temperatura, las diferencias entre los puntos dentro del baño termostático no superen 0.5°C (ver Tabla 2) entre ellos.

Tabla 2: Tiempo de esterilización y temperatura de incubación para la valoración de cada vitamina

	Biotina	Vitamina B ₁₂	Ácido fólico
Tiempo de esterilización (a 121°C)	10 minutos	5 minutos	5 minutos
Temperatura de incubación	30°C	34°C	34°C

Finalizada la incubación, se retiran los tubos del baño termostático y se colocan en refrigerador para interrumpir el crecimiento.

Se mantienen en heladera hasta el momento de comenzar la lectura en espectrofotómetro. Previamente a la lectura estos tubos deben llevarse a temperatura ambiente. Finalmente se mide la transmitancia en espectrofotómetro a 570 nm, utilizando el blanco sin inocular como 100% de transmitancia.

Se calcula el contenido de vitamina aplicando el estadístico apropiado. El diseño presentado en este trabajo es el de rectas paralelas.

El cálculo estadístico se encuentra en la Farmacopea Europea con el título Análisis estadístico – Modelo de líneas paralelas. ⁽³⁾

Para que la valoración sea satisfactoria se tienen que cumplir una serie de requisitos:

- Los blancos inoculados, los cuales sólo contienen medio de cultivo y el microorganismo correspondiente, no debe mostrar crecimiento. Si se observara que estos blancos se encuentran contaminados, se podrá concluir que se está en presencia de algún inconveniente con el agua, el medio o el microorganismo utilizado.
- Se obtendrán dos líneas correspondientes al estándar y a la muestra. Estas líneas deben mostrar regresión, linealidad y paralelismo. Estas características son verificadas mediante el cálculo estadístico. Si alguna de las tres no cumpliera con la especificación el ensayo es considerado inválido y deberá repetirse.

Si el ensayo es válido, se calcula el contenido de vitamina por unidad de producto, y el intervalo de confianza, el cual debe hallarse dentro del 15%.

Las valoraciones se realizan por duplicado. El resultado final es el promedio de los dos valores obtenidos, los cuales se consideran promediables si su desviación estándar porcentual es máximo 15%. Si la diferencia es mayor a este valor, se repite la experiencia, obteniéndose otros dos nuevos valores.

En general se utiliza el cálculo de tres dosis, pero es posible utilizar un cálculo estadístico con dos dosis si, habiendo realizado la validación del método y una cantidad de valoraciones suficientes se puede asegurar que se está trabajando dentro del rango de linealidad (opción a ser evaluada por autoridades del país).

Curva dosis- respuesta

Previamente a comenzar con el ensayo de valoración de vitaminas como fue expuesto en “Procedimiento del ensayo” debe determinarse en qué zona de la curva de crecimiento se debe trabajar. Con esta finalidad se realiza una curva dosis-respuesta.

Procedimiento para realizar curva dosis-respuesta

Se toman 10 concentraciones de estándar con un factor de dilución de 1:2 (por ejemplo) entre cada una de ellas. Se cargan tubos de ensayo por cuadruplicado con 100 µl de cada una de las 10 concentraciones. Se agrega 9.9 ml de medio de cultivo. También preparar los cuatro tubos de blanco, dos de ellos no se inocularán y dos serán inoculados.

Continuar con el mismo procedimiento expuesto en “Procedimiento de ensayo” y finalmente leer sus transmitancias. Se obtienen 4 lecturas de transmitancias por cada una de las 10 concentraciones. Se expresan las transmitancias en absorbancias. Promediar estos 4 valores de tal forma de obtener un valor de absorbancia por cada concentración. Ver Tabla 3.

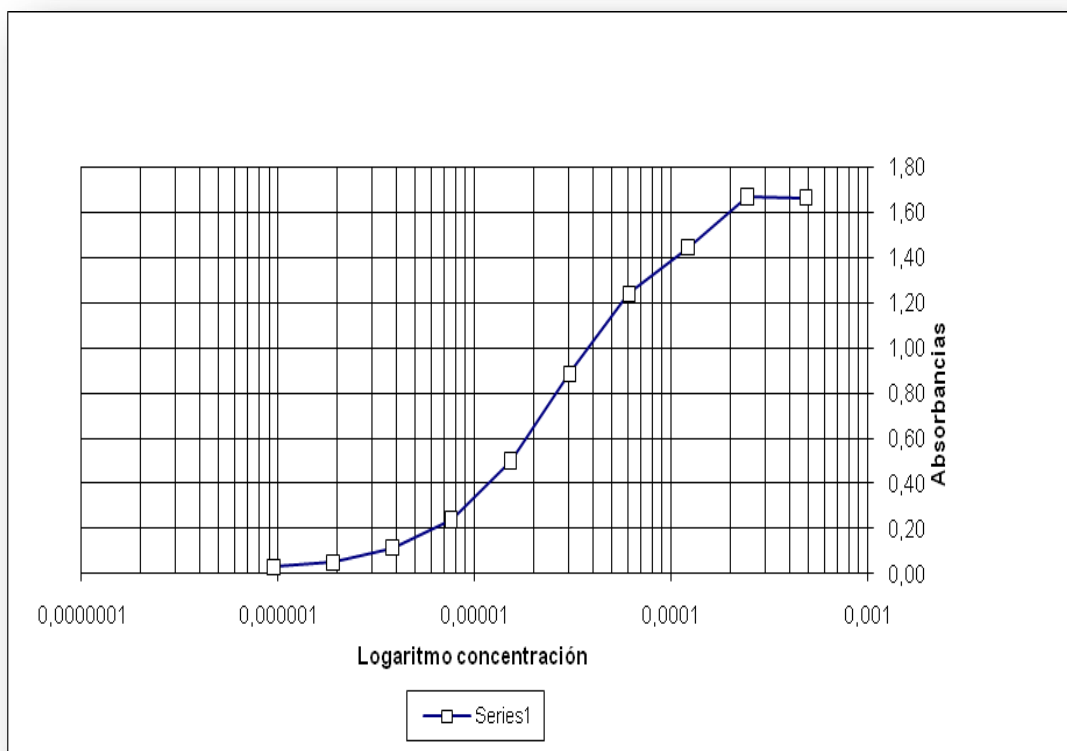
A partir de esta información se puede graficar absorbancias en función de logaritmo de la concentración (Ver Gráfico 1). También se puede aplicar el cálculo estadístico para evaluar en que rango de esta curva se cumplen las especificaciones de regresión y linealidad.

En el Gráfico 1 se observa que existen dos zonas donde no se observa regresión. Esto es a concentraciones muy bajas o concentraciones muy altas.

Tabla 3: Curva dosis respuesta

Concentración de vitamina X por tubo expresada en mcg/ml									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4,9E-04	2,4E-04	1,2E-04	6,1E-05	3,0E-05	1,5E-05	7,6E-06	3,8E-06	1,9E-06	9,5E-07
Resultados obtenidos									
Transmitancias									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2,13	2,145	3,169	7,536	15,791	30,45	52,907	80,84	87,544	90,288
2,025	2,231	3,723	5,293	12,73	37,625	61,389	76,91	83,218	96,413
1,997	2,171	4,118	4,823	11,259	29,813	60,754	75,385	92,57	97,116
2,513	2,007	3,445	5,714	12,688	28,996	55,756	74,245	93,063	89,58
Absorbancias									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,67	1,67	1,50	1,12	0,80	0,52	0,28	0,09	0,06	0,04
1,69	1,65	1,43	1,28	0,90	0,42	0,21	0,11	0,08	0,02
1,70	1,66	1,39	1,32	0,95	0,53	0,22	0,12	0,03	0,01
1,60	1,70	1,46	1,24	0,90	0,54	0,25	0,13	0,03	0,05
Promedio de las absorbancias									
1,67	1,67	1,44	1,24	0,89	0,50	0,24	0,11	0,05	0,03

Gráfico 1: Curva dosis respuesta



Cálculo estadístico para determinar rango de concentraciones donde se debe trabajar.

Aplicar el estadístico nombrado en el punto “Procedimiento del ensayo” teniendo en cuenta los términos correspondientes a estándar, evaluando sólo la regresión y linealidad.

A partir de esta información se diagrama el ensayo de rutina, teniendo en cuenta cuál es el rango lineal y que presenta regresión en la curva.

Validación del método de valoración microbiológica

Definiciones:

- *Validación:* Es el proceso por el cual mediante estudios en el laboratorio se prueba que un método es adecuado para la aplicación analítica al que está destinado.
- *Especificidad:* Es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera puedan estar presentes.
- *Rango:* es el intervalo en el cual, en el caso de valoración microbiológica, cumple con regresión, linealidad, paralelismo y precisión.
- *Precisión:* Es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa de una serie de mediciones.

La precisión puede ser tomada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto (la valoración es realizada en un mismo día por un solo analista). La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos)

Procedimiento de validación del método de valoración microbiológica

- Especificidad:
Se puede considerar que la especificidad de este método está dada por los microorganismos utilizados en la determinación de cada vitamina.
- Linealidad, regresión y paralelismo
Al realizar un ensayo de estándar y muestra, y aplicar el estadístico de rectas paralelas para tres dosis por triplicado, debe verificarse el cumplimiento de una regresión significativa y las rectas deben ser paralelas y lineales dentro de un determinado rango. Estas condiciones deben verificarse mediante pruebas de validez para una determinada probabilidad, generalmente $p=0,05$
- Rango:
Debe documentarse el rango para el cual el método cumple con la especificación para regresión, paralelismo y linealidad.
- Precisión:
 - Repetibilidad: La valoración debe ser realizada sobre un lote de producto por sextuplicado, por un solo analista en un mismo día
 - Precisión intermedia: Realizar la valoración sobre el mismo lote de producto por sextuplicado, en seis días distintos. Si es posible la misma debe ser realizada por distintos analistas.

En cada caso, se obtienen 6 resultados, los cuales no deben diferir en más de 7.5% en su desviación estándar porcentual para que el método se considere validado.

Bibliografía recomendada:

1. *Analytical Microbiology* – edited by Frederick Kavanagh (1963)
2. *Analytical Microbiology* – edited by Frederick Kavanagh (1972) Volumen II
3. Farmacopea Europea – capítulo 5.3

Control Microbiológico de Cosméticos

Esteban Zarankin

- *Introducción*
- *Fuentes de contaminación*
- *Deterioro microbiano*
- *Conservadores*
- *Parámetros de control microbiológico*
- *Control higiénico*
- *Bibliografía*

Introducción:

Según la Resolución N° 155/98 ANMAT, se entiende como productos cosméticos para la higiene personal y perfumes, a aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiar su apariencia, protegerlas o mantenerlas en buen estado y/o corregir olores corporales. Estos productos no podrán proclamar actividad terapéutica alguna: <1>

La mayoría de los productos cosméticos, debido a que contienen un elevado porcentaje de agua o extractos de origen vegetal, y que muchas de las sustancias utilizadas en su formulación pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, son productos susceptibles a contaminaciones microbiológicas.

La presencia de microorganismos en los productos cosméticos puede producir cambios en el aspecto físico, color, olor y textura, y puede representar un riesgo para la salud del consumidor.

Los factores principales que inciden en que los microorganismos puedan proliferar en los productos cosméticos están vinculados a las características del producto, cantidad de microorganismos que contaminan el producto, el material de empaque primario, temperatura de almacenamiento y proceso de elaboración y envasado.

Las características del producto son de suma importancia, ya que si los microorganismos no pueden sobrevivir o proliferar debido a las condiciones que encuentran en los mismos, difícilmente presente un problema.

Entre las características del producto que influyen en forma directa podemos nombrar la disponibilidad de agua o actividad acuosa (Aw), el pH, contenido de nutrientes, el potencial de óxido reducción y la presión osmótica

Fuentes de contaminación:

Normalmente el origen de la contaminación de los productos cosméticos proviene de alguna o algunas de las siguientes fuentes:

1. Materia prima
2. Medio ambiente

3. Equipos utilizados durante su elaboración y envasado
4. Material de empaque primario
5. Personal que manipula el producto

Materias primas

Las materias primas de origen natural, como productos derivados de origen animal y extractos vegetales, con frecuencia son más propensos a la proliferación microbiana que las materias primas de origen sintético.

El agua es uno de los ingredientes más extensamente usados y es responsable de la mayoría de los casos de contaminación; por lo cual el control periódico del agua (independientemente del origen) es de suma importancia. La identificación y control microbiológico de todas las materias primas que pueden originar una contaminación microbiológica debe ser la primera barrera para evitar que los microorganismos entren en contacto con el producto.

Medio ambiente

En el aire se encuentran en suspensión gran cantidad de microorganismos en forma vegetativa y esporulada. El manejo adecuado de las áreas donde el producto queda expuesto es importante para evitar que los microorganismos entren en contacto con el producto. Aunque en la práctica no es una causa habitual de contaminación, puede ser que los microorganismos involucrados, en ciertas condiciones favorables, proliferen en el producto.

Equipos utilizados durante su elaboración y envasado

Los equipos son una fuente común en la contaminación de los productos cosméticos. Las principales causas de que ocurra esto están relacionadas con la insuficiente limpieza en áreas particulares de los equipos donde se pueden acumular los microorganismos.

El tipo de microorganismo que se desarrolla en tales áreas depende de los nutrientes disponibles y de las condiciones ambientales, especialmente del pH y de la temperatura.

Es imprescindible evitar la formación de *biofilms*, ya que los mismos son muy difíciles de erradicar y generan una fuente constante de microorganismos capaces de contaminar los productos que se elaboran y/o envasan. Es recomendable realizar validaciones de limpieza para todos los equipos involucrados en los procesos de elaboración y envasado.

Material de empaque primario

Los envases de plástico y vidrio usualmente poseen un bajo número de microorganismos, pero como resultado de un acondicionamiento deficiente es posible que contengan bacterias esporuladas como *Bacillus* spp o esporas de hongos como *Penicillium* spp o *Aspergillus* spp. Es recomendable que el material de empaque primario almacenado se acondicione en depósitos que cuenten con procedimientos de limpieza que minimicen el polvo ambiental.

Personal que manipula el producto

Es necesario un estricto control de los procedimientos para evitar que los microorganismos puedan ser transferidos a los productos desde el personal que trabaja en la elaboración y/ o envasado. Esto constituye un grave peligro ya que de esta manera un producto puede contaminarse con microorganismos patógenos como por ejemplo *Staphylococcus aureus* que puede estar presente en la piel, y *Escherichia coli* debido a una inadecuada higiene personal.

Es necesario cumplir con un monitoreo de manos y llevar un estricto control del personal que está autorizado para ingresar a las áreas productivas.

Deterioro microbiano:

Como consecuencia del crecimiento microbiano pueden producirse las siguientes alteraciones del producto:

- Cambio de color.
- Sedimentación

- Producción de malos olores.
- Separación de fases en las emulsiones.
- Alteración de las propiedades reológicas
- Observación directa de microorganismos
- Disminución de la viscosidad.

Conservadores:

La mayoría de los productos cosméticos tienen conservadores (agentes antimicrobianos de diversa naturaleza) que evitan que los microorganismos proliferen en ellos.

Características que debe tener un conservador:

- Debe ser de amplio espectro (actividad contra hongos, levaduras, bacterias Gram positivas y Gram negativos)
- Tiene que ser soluble en cualquier fase de la formulación (acuosa o la oleosa).
- Eficiente a bajas concentraciones
- Debe ser completamente estable
- Debe ser incoloro e inodoro
- Tener un rango de pH amplio
- Compatible con la formulación y con todos los ingredientes que la forman.

Conservadores utilizados habitualmente en la industria cosmética:

Ácidos:

- Ácido benzoico y sus sales
- Ácido dehidroacético y sus sales
- Ácido p-hidroxibenzoico (sus sales y ésteres) (parabenos)
- Ácido sórbico y sus sales

Alcoholes

- Alcohol bencílico
- Alcohol 2,4-diclorobencílico

Derivados fenólicos

- Fenoxietanol
- Triclosán

Donadores formaldehído

- Diazolidinil urea
- Imidazolidinil urea
- Quaternium-15
- DMDM hidantoína

Otros

- Clorometilisotiazolinona + metilisotiazolinona

Es necesario evaluar la efectividad de los conservadores en el producto. Para ello se recomienda realizar dichos ensayos según USP <2> o CTFA <3>. La efectividad de los conservadores se evalúa inoculando el producto con un microorganismo o con un pool de ellos según la técnica utilizada. El producto se debe dejar a temperatura ambiente o a temperaturas especificadas durante un cierto período de tiempo prefijado hasta 28 días, examinándose periódicamente para contabilizar los microorganismos sobrevivientes en cada tiempo señalado.

Tabla 1: Conservadores habitualmente utilizados y sus agentes neutralizantes.

CONSERVADORES	AGENTES NEUTRALIZANTES
Alcoholes	Dilución - Tween 80
Aldehídos	Dilución - Bisulfito de sodio
Amonio cuaternario	Lecitina 0.1% + Tween 80 al 0.7%
Benzoatos	Dilución – Tween 80
Dowicide 200	Lecitina, aniónicos, no iónicos, talco, CMC.
Germall (II-115)	No iónicos, bentonita, CMC.
Hidrogeno peróxido	Catalasa
Kathon CG	Dilución
Parabenos	pH >8; Tween 80
Triclosán	Lecitina -Tween 80

Para evitar que los conservadores impidan que los microorganismos sean recuperados del producto, la elección de los agentes neutralizantes es crítica. En la Tabla 1 se encuentra un listado de conservadores habitualmente utilizados en la industria cosmética y los agentes neutralizantes que se pueden utilizar

Otro procedimiento de neutralización de conservadores incluye la filtración por membrana.

PARAMETROS DE CONTROL MICROBIOLOGICO:

En la Argentina los Controles Higiénicos deben cumplir con la Disposición 1108/99 (Anexo II) <4>, según Tabla 2.

Tabla 2. Disposición 1108/99. Anexo II. ANAMAT

	ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
TIPO - I	Productos para uso infantil Productos para área ocular Productos que entran en contacto con mucosa	a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales, no más de 10^2 UFC/g o ml. Límite máximo 5×10^2 UFC/g o ml. b) Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1 g o ml c) Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o ml. d) Ausencia de Coliformes totales y fecales en 1 g o ml. e) Ausencia de Clostridios sulfito reductores en 1 g *
TIPO - II	Demás productos susceptibles de contaminación microbiológica	a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales, no más de 10^3 UFC/g o ml. Límite máximo 5×10^3 UFC/g o ml. b) Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1 g o ml c) Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g o ml. d) Ausencia de Coliformes totales y fecales en 1 g o ml. e) Ausencia de Clostridios sulfito reductores en 1 g *

* Exclusivamente para productos que contienen talcos

Control Higiénico de productos cosméticos:

Materiales y equipos:

1. Pipetas graduadas, estériles de 2 ml, 5 ml y 10 ml.
2. Erlenmeyers y vasos de precipitado estériles.
3. Placas de petri de 20 x 100 mm estériles.
4. Varillas de vidrio estériles
5. Tubos de ensayo de 20 x 200 mm estériles.
6. Paños de gasa estériles.
7. Instrumentos, pinzas, tijeras, bisturíes, hojas de bisturí, espátulas estériles.
8. Balanza con sensibilidad 0.01 g
9. Estufas de incubación reguladas de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Medios de cultivo y soluciones:

- Agua peptonada 0.1 % con Polisorbato-20 4 % y Lecitina 0.5 %. (PLP)
- Caldo triptona soya (TSB).
- Caldo Tioglicolato con indicador. (solo polvos o talcos)
- Caldo verde brillante bilis 2 % (CVB).
- Agar EMB levine (EMB)
- Agar Manitol salado, Agar Vogel-Jhonson o Agar Baird Parker.
- Agar Cetrimide. (AC)
- Agar triptona soya (TSA).
- Agar base HC (HC)
- Medios de cultivo para pruebas bioquímicas de identificación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Solución fisiológica.

Reactivos:

- Tween 20
- Agua destilada
- Alcohol etílico 70°
- Plasma de conejo
- Colorantes para coloración de Gram
- Reactivos para revelar pruebas bioquímicas
- Parafina estéril

Manipulación de muestras:

A continuación se detallan recomendaciones para el manipuleo correcto de las muestras.

- Analizar las muestras lo más pronto posible luego de su llegada al laboratorio. Si fuese necesario almacenarlas, hacerlo a temperatura ambiente.
- Inspeccionarlas cuidadosamente antes de abrirlas verificando las irregularidades de sus envases.
- Desinfectar con una solución 70 % etanol (v/v) + 1 % HCl (v/v) o algún otro desinfectante de amplio espectro que no ataque el material de empaque ^{<5>}. De ser necesario se debe secar el envase con una gasa o paño estéril.
- Para cada análisis microbiológico, es preciso utilizar una porción representativa del contenido de la muestra. Usar una porción de 10 g o ml
- Si hubiere necesidad de análisis múltiples, estudios microbianos, toxicología y química, la submuestra para el examen microbiológico deberá ser retirada en primer lugar.

Preparación de la muestra:

En la preparación de la muestra a ser ensayada, no deberá producirse alteración del número o tipo de microorganismo originalmente presente.

Se tomará de un envase 10 g o ml de muestra, si es necesario analizar varios envases que contengan el mismo producto y que provengan del mismo lote, se procederá a la extracción de una fracción equivalente de cada envase hasta completar los 50 g o ml de muestra en un vaso de precipitado estéril, y se homogeneizará. Esta mezcla será considerada la muestra.

La muestra deberá ser removida asépticamente, transfiriendo 10 g o ml en un recipiente estéril para cada una de las pruebas descriptas.

Preparación de la solución madre:

Muestras líquidas: Se debe agregar 10 ml en 90 ml de PLP o el diluyente que contenga los agentes neutralizantes de los conservadores (dilución 10^{-1}), se agitará y se lo colocará durante 10 minutos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Muestras sólidas / semisólidas: Se debe agregar 10 g en 90 ml de PLP o el diluyente que contenga los agentes neutralizantes de los conservadores (dilución 10^{-1}) utilizando un agitador Vortex se homogeneizará y se lo colocará durante 10 minutos a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Es recomendable utilizar perlas de vidrio estériles para facilitar la dispersión de la muestra en el diluyente

Método de recuento en placa:

Se tomará 5 ml de la solución madre y se pipeteará 1 ml en 4 placas de petri estériles y en un tubo que contenga 9 ml de solución fisiológica (SF). Se agregará rápidamente a dos placas 10 ml de medio TSA, y a las otras dos 10 ml del medio (HC), que se han sido previamente fundidos y enfriados a 45°C . Se repetirá la metodología anterior, dos veces más hasta llegar a una dilución 1/100 de la solución madre. Se cubrirán las placas de Petri y se mezclarán por rotación, se dejarán solidificar a temperatura ambiente.

Se invertirán las placas de TSA para incubarlas por 48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Las placas de HC se incubarán sin invertirse durante 72 horas a $27,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Luego de la incubación se examinará el crecimiento en las placas, se contarán el número de colonias y se expresará el promedio de las dos placas en términos de número de microorganismos por g o ml de muestra. El número de unidades formadoras de colonias por placa para ser considerada deberá ser mayor a 25 y menor a 250. Multiplicar por el factor de dilución para expresar los resultados

Si no se contarán colonias en la dilución 10^{-1} se expresará el resultado como “<10 unidades formadoras de colonias por g o ml de muestra”. Se recomienda realizar un control negativo utilizando solo PLP o el diluyente utilizado.

Test para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*:

Se tomarán 10 ml de la solución madre y se los agregará a 90 ml de TSB. Se mezclará e incubará a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Se examinará el medio para detectar crecimiento, y si este está presente, se repicará en superficie con ansa en una placa de petri con los medios Vogel-Johnson-agar y Cetrimida agar. Se cubrirán, invertirán e incubarán las placas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Tabla 3: Características de *Staphylococcus aureus* en medios selectivos

Medio selectivo	Agar Vogel-Johnson	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker
Características morfológicas	Colonias negras rodeadas de un halo amarillo	Colonias amarillas con halo amarillo	Colonias negras brillantes con halo claro de 2 a 5 mm
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en racimos	Cocos Gram positivos en racimos	Cocos Gram positivos en racimos
Test de coagulasa	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 4: Características de *Pseudomonas aeruginosa* en medios selectivos

Medio selectivo	Agar Cetrimide	Agar F para <i>Pseudomonas</i> Detección de fluoresceína	Agar P para <i>Pseudomonas</i> Detección de piocianina
Características morfológicas	Colonias generalmente verdes	Generalmente incolora a amarilla	Generalmente verdosas
Fluoresceína Luz UV	Verde	Amarilla	Azul
Test de oxidasa	Positiva	Positiva	Positiva
Coloración Gram	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Bacilos Gram negativos

Si luego de la incubación ninguna de las colonias desarrolladas tiene las características detalladas en las Tablas 3 o 4, la muestra cumplirá con los requerimientos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Si se detectara colonias sospechosas se realizarán los test de coagulasa y oxidasa respectivamente, y se utilizarán otros medios selectivos.

Prueba de la coagulasa para *Staphylococcus aureus*:

Con la ayuda de un ansa de cultivo, se transferirán las colonias sospechosas desde la superficie de agar Vogel Johnson o Baird Parker o Manitol salado a tubos de hemólisis que contengan cada uno 0,5 ml de plasma de conejo recién extraído. Se incubarán en baño de agua a 37 ± 2 °C examinando los tubos a las 3 horas y subsiguientemente a intervalos regulares hasta 24 hs. Se realizarán controles positivos y negativos simultáneamente con la muestra problema. .

Prueba de oxidasa y de pigmentos para *Pseudomonas aeruginosa*:

A partir del agar Cetrimide se sembrará con ansa en placa de petri con los medios para detectar fluoresceína y piocianina. Incubar a $35^\circ \pm 2$ °C por un período de tiempo no inferior a 3 días.

Se examinarán las estrías de crecimiento a la luz UV. Observando las características descritas en la tabla 2. Se hará la prueba de oxidasa con el crecimiento sospechoso, y se transferirán esas colonias a discos de papel de filtro que han sido impregnados con diclorhidrato de N,N dimetil-p-fenilendiamina. La observación de un color rosa, cambiando a púrpura indicaría que la prueba de oxidasa es positiva.

Test para bacterias coliformes:

Se tomarán 10 ml de la solución madre y se agregarán a un tubo que contenga 10 ml de CVB en doble concentración con una campana de Durham, se incubarán a 35 ± 2 °C por 48 hs. El medio se examinará para ver la presencia o ausencia de gas dentro de la campana, si el gas estuviera presente, se tomará una anizada, y se repicará en un tubo de CVB con 10 ml y campana de Durham en concentración simple a 44°C por 48 hs. para detectar presencia de coliformes fecales. Si se presentará gas en la campana de Durham se sembrará una placa de EMB a 35 ± 2 °C durante 48 hs y se identificarán las colonias sospechosas.

Bibliografía:

1. Resolución 155/98 (M.S. y A.S.) Artículo 2°. 1998
2. United States Pharmacopeia. USP. 34 ed. 2011.
3. CTFA-Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Microbiology Guidelines. Curry A., McEwen (eds.) Washington D.C.
4. Disposición 1108/99. ANMAT. Anexo II. 1998
5. U.S.Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM).Chapter 23. 8th.ed. 2001

Control Microbiológico de Aguas

Mónica Lagomarsino y Sergio Iglesias

- *Introducción*
- *Tipos de agua*
- *Muestreo*
- *Métodos de recuento*
- *Métodos para la investigación de microorganismos indicadores*
- *Establecimiento de límites y evaluación de resultados*
- *Resultados fuera de límites*
- *Bibliografía*

Introducción

El agua es la sustancia más utilizada en la industria farmacéutica, ya sea como ingrediente de productos, o durante alguna etapa de la elaboración, o para el lavado del equipamiento. Es importante el monitoreo microbiológico del agua al ingreso a planta de tratamiento, y en las etapas de purificación, almacenamiento y distribución del agua, debido a que los microorganismos pueden proliferar en dicho sistema, afectando la calidad del agua y por lo tanto del producto elaborado.

Los métodos de control de productos no estériles descritos en las farmacopeas no son aptos para ser utilizados para el análisis de aguas, ya que para éstas se han elaborado algunos medios de cultivo que son adecuados para el desarrollo de microorganismos que están habituados a vivir en un medio sin material orgánico ni sales, y en ocasiones injuriados por el hipoclorito de sodio agregado para mantener los niveles bajos de carga microbiana.

El objetivo de este capítulo es hacer una reseña de los métodos que pueden utilizarse en el control microbiológico de las aguas. Dado que por lo general no hay normas respecto a la elección del procedimiento, es responsabilidad del microbiólogo justificar y documentar la elección del método, demostrando la aptitud del método elegido. Esta demostración no puede realizarse por un método de recuperación tal como se efectúa para los métodos de productos. Los autores de este capítulo han observado en pruebas efectuadas que a pesar de que el medio R2A es el indicado para recuentos de aguas, y que los contaminantes mayoritarios pertenecen al género *Pseudomonas*, con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 el recuento obtenido en Agar Triptona Soya (TSA) es mayor que el obtenido en Agar R2A, lo que demuestra que esta cepa utilizada habitualmente en control de medios de cultivo y en validaciones de métodos, no es adecuada para validar métodos de aguas. Habitualmente se elige el mejor método por comparación entre los resultados de ensayos efectuados en paralelo utilizando muestras reales de aguas con la microflora propia del lugar donde se encuentra ubicado el sistema de purificación de agua que se quiere controlar.

Tipos de Aguas

A continuación se detalla la clasificación de aguas para uso farmacéutico, de acuerdo al uso que se intenta dar y a su método de obtención:

Agua potable:

No se utiliza para elaborar productos farmacéuticos, pero en general los sistemas de purificación parten de este tipo de agua. Los límites microbianos en general varían según el país. En Argentina el Código Alimentario Argentino (art. 982) ⁽¹⁾ especifica un Recuento de bacterias mesófilas de no más de 500 UFC/ml en agar (APC - 24 hs a 37 °C); un Recuento de Coliformes totales de no más de 3 NMP (número más probable) en 100 ml, y ausencia de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml.

Agua Purificada:

El Agua Purificada se obtiene a partir del Agua Potable a través de un proceso de purificación, que comprende una decoloración, ablandado y deionización por uno o más de los procesos siguientes: intercambio iónico, ósmosis inversa, electro deionización, destilación, filtración. Respecto de los límites microbianos, el agua purificada debe cumplir con un recuento de no más de 100 UFC/ ml, aunque algunos productos pueden requerir un agua de una calidad superior. Por ejemplo, cuando un agua se utiliza para elaborar un producto acuoso cuyo límite de recuento microbiano es 100 UFC/ ml, el agua que forma parte de ese producto no puede tener una especificación equivalente al producto terminado, por lo que es necesario tener un sistema que asegure una calidad de agua de por ejemplo menos de 100 UFC en 10 o 100 ml de agua.

Las farmacopeas no indican especificaciones para microorganismos específicos, sin embargo cuando el agua se va a utilizar para la elaboración de productos en los cuales debe haber ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, es conveniente asegurar durante el monitoreo del agua su ausencia, por ejemplo en 100 ml.

Agua para Inyectables:

El agua para inyectables se obtiene por destilación a partir de agua purificada, aunque en algunos países podría considerarse aceptable el agua obtenida por ósmosis inversa o por ultrafiltración.

Desde el punto de vista microbiano debe cumplir con un límite de no más de 10 UFC en 100 ml de agua y con no más de 0.25 EU/ ml de Endotoxinas bacterianas.

Muestras

Los recipientes para el muestreo pueden ser envases de vidrio borosilicato o plástico, o bien bolsas estériles. En caso que el agua sea clorada, es necesario agregar un agente reductor. Se utiliza para ello solución de Tiosulfato de Sodio la cual puede agregarse al envase antes de esterilizar teniendo en cuenta que 0.1 ml de una dilución al 3% en una muestra de 120 ml neutralizará más de 5 mg/ ml de cloro residual ⁽²⁾. Existen en el mercado bolsas de plástico esterilizadas que contienen para este fin comprimidos de Tiosulfato de Sodio en su interior.

Las muestras de agua deben ser analizadas lo más pronto posible para evitar cambios en el recuento microbiano. En caso de no ser posible su análisis dentro de la hora posterior a su colección, la muestra debe transportarse y conservarse en lo posible entre 2 y 10°C. No exceder las 8 hs hasta efectuar el recuento, y no exceder las 30 hs hasta el análisis de bacterias coliformes ⁽²⁾. Los registros de muestreo, recepción y análisis deben poder demostrar que los tiempos establecidos en el procedimiento se cumplen.

Si bien la sanitización externa de la válvula y posterior *flushing* o descarte de agua, podría eliminar el riesgo de que microorganismos que están en el último tramo de la cañería puedan ir a la muestra ocasionando recuentos altos, estos procedimientos se utilizan sólo cuando los puntos son sólo de muestreo y no puntos de uso. En caso de tratarse de puntos de uso para elaboración de productos farmacéuticos, el muestreo debe repetir exactamente la extracción del agua que se usa en producción. Esto se hace para asegurar que los recuentos obtenidos en los puntos de uso representan los recuentos reales del agua que se utiliza directamente en el producto que se va a elaborar. Si el agua se recoge para su uso a través de una manguera, la muestra también debe tomarse de la misma manera. Por lo general las mangueras cuando no se utilizan deben retirarse o dejarse colgando para que puedan escurrir e impedir que quede agua estancada en su interior. Igualmente con una frecuencia que se debe establecer, las mangueras se limpian o mejor aún, se esterilizan por autoclave.

Método de recuento

El recuento microbiológico puede efectuarse por el método de volcado en placa – *pour plate* - o por el de filtración, este último cuando el volumen de agua a analizar es grande (> 5 ml) y el recuento es bajo.

Los medios de cultivo que se utilizan para el recuento pueden ser de altos o de bajos nutrientes. Entre los medios de altos nutrientes, el Plate Count Agar (PCA) es el más ampliamente utilizado y recomendado por la USP⁽³⁾. Sin embargo recuentos más altos se obtienen cuando se utilizan medios de bajos nutrientes como el R2A – indicado por la Eur. Ph ⁽⁴⁾, aunque debe tenerse en cuenta que este medio requiere mayor tiempo de incubación.

Los autores del presente capítulo han efectuado ensayos en paralelo con ambos medios de cultivo, y han observado, sobre todo cuando se utiliza el método por filtración, que las colonias obtenidas con el medio R2A son más pequeñas, translúcidas e incoloras que las obtenidas con PCA, dificultando el recuento, el que por lo general para ser confiable, debería realizarse con un microscopio estereoscópico o lupa estereoscópica con luz incidente superior en un ángulo de 45°.

Los tiempos de incubación pueden variar según el medio de cultivo y la microflora contaminante. Por ejemplo la bacteria *Methylobacterium mesophilicum* es una habitual contaminante de sistemas de agua –desarrolla como colonias de color rosa- de crecimiento muy lento tanto en medios de cultivo como el TSA y el R2A (> 5 días a 30-35°C). La USP ⁽³⁾ para el monitoreo de Agua Purificada recomienda el control de cómo mínimo de 1.0 ml de agua purificada por método de volcado en placa y medio PCA con incubación durante como mínimo 48 a 72 hs a 30-35°C La Eur. Ph. ⁽⁴⁾ en la monografía *Water, Purified* indica un volumen apropiado de muestra relacionado al resultado que se espera obtener, y por método de filtración con medio R2A a 30-35°C durante no menos de 5 días. La USP, en el capítulo <1231> también sugiere la incubación a 20-25°C cuando se utilizan medios con bajos nutrientes, con un período de incubación de 5 a 7 días, aunque para recuperar microorganismos de crecimiento lento o injuriados, puede requerirse un tiempo de incubación más largo y hasta 14 días.

Según el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*⁽²⁾, los recuentos más altos se obtienen cuando se incuba entre 5 y 7 días a 20-28°C, manteniendo la humedad para que las placas no pierdan más que el 15% de agua.

Para el monitoreo de Agua para Inyectables (WFI), el volumen mínimo de análisis es 100 ml que se filtran a través de membrana (5,2), aunque la Farmacopea Japonesa establece un volumen mínimo de 200 ml.

Los medios de cultivo utilizados para el recuento por el método de volcado en placa, deben estar fundidos y mantenidos a 44-46°C. Lo ideal es comprobar previamente la temperatura de los medios de cultivo. Para lograrlo sin afectar la esterilidad del medio, ese control puede efectuarse por medio de un termómetro infrarrojo, el cual mide la temperatura a distancia y sin ser introducido dentro del recipiente, o validando los tiempos de estabilización de los medios en estufas con temperatura controlada.

Los recuentos por el método de volcado en placa deben efectuarse al menos por duplicado, promediando el recuento obtenido en cada placa; y debe efectuarse una placa de control negativo del medio de cultivo. Esta placa será tomada en cuenta para descartar una posible contaminación en el laboratorio, por ejemplo que el medio de cultivo esté contaminado, en caso de obtenerse un recuento alto.

Cuando se utiliza el método de volcado en placa, el recuento más preciso es aquel en el que en cada placa se pueden contar entre 30 y 300 colonias - la USP en el capítulo <1227> señala al rango de 25 - 250 colonias como el más preciso-. La necesidad de fijar un rango de lectura se debe a que un recuento menor al rango va acompañado de un error estadístico; y cuando el recuento es mayor al rango las colonias que se forman compiten por los nutrientes del medio y pueden adquirir tamaño menor o no desarrollar. Sin embargo por lo general, y cuando el sistema de aguas está bajo control, los recuentos son nulos o casi nulos, aún con mayores volúmenes de muestra

En el caso en que el recuento sea nulo, no se debe informar como cero, sino como <1 UFC/ ml o en el volumen que ha sido inoculado en la placa (ej <1/10 ml o <1/100ml), o, en el caso de haberse analizado una dilución de la muestra, multiplicando el promedio del recuento obtenido en cada placa por el correspondiente factor de dilución, en ese caso si el recuento resulta nulo se debe informar como “Menos UFCs que el factor de dilución /ml”, por ejemplo, para una siembra por volcado en placa de 1 ml de una dilución 1:10, cuando no hay colonias se informa como “<10 UFC/ml”.

Si el número de colonias supera las 300 UFC, y no se previó una dilución de la muestra, se podría informar como TNTC (*too numerous to count*) o “incontables”, sin embargo en estos casos un método que se puede emplear es el descrito por *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* ⁽²⁾:

- En el caso de realizar el análisis por volcado en placa si hay más de 10 colonias pero menos de 100 en 1 cm², contar 13 cuadros independientes de 1 cm² en un contador de colonias, sumar los recuentos y multiplicar por 5 (en placas de 9 cm de diámetro). Cuando hay más de 10 colonias en 1 cm², contar 4 cuadros representativos, promediar y multiplicar por 57 (para placas de 9 cm de diámetro). En todos estos casos el valor obtenido se debe expresar como *estimado (e)*. Cuando hay más de 100 colonias por cm², informar como >5700 UFC en el volumen de agua sembrada”, o multiplicar por el factor de dilución empleado.
- Si se emplea el método por filtración, donde el rango de lectura recomendado por membrana es de 20-200 UFC, si el número de colonias en una membrana cuadrículada es menor o igual a 2 por cuadro, contar todas las colonias. Si hay entre 3 y 10 colonias por cuadro contar 10 cuadros, promediar y multiplicar por 100. Para 10 a 20 colonias por cuadro contar 5 cuadros, promediar y multiplicar por 100. Nuevamente en todos estos casos el valor obtenido se debe expresar como *estimado (e)* Si hay más de 20 colonias por cuadro informar como >2000 UFC en el volumen filtrado.

Otro método puede emplearse, y si debe estar descrito en un procedimiento.

Aptitud del método de recuento de aguas: Como se expresó anteriormente, existe una dificultad para efectuar la prueba de aptitud de los métodos de recuentos, lo cual es fácil de efectuar para otros controles microbiológicos, sin embargo no para el agua, lo cual trataremos de explicar:

Los microorganismos que habitualmente son contaminantes del Agua Purificada son *Pseudomonas*, *Burkholderia* y otras, adaptadas por lo general a crecer en un ambiente con muy bajos nutrientes. Si se comparan los recuentos obtenidos con cepas de colección no adaptadas a bajos nutrientes como la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medios TSA, PCA y R2A, el mayor recuento se obtiene en TSA, sin embargo cuando el agua contiene *Pseudomonas* spp, el mayor recuento se obtiene en R2A. Eso se explicaría por las características propias del R2A de ser un medio con bajos nutrientes que representaría mejor el ambiente de la microflora del agua purificada. Por otro lado se debe considerar el estado metabólico de las cepas salvajes, a veces injuriadas por el procedimiento de purificación, o previamente por la cloración del agua potable que ingresa al sistema de purificación. Por todo esto es difícil evaluar la aptitud del método de recuento con cepas de colección.

La manera de elegir el mejor método (mejor método significa “con el que más recuento se obtiene”) es efectuando ensayos en paralelo con los distintos medios y condiciones de incubación a evaluar y posteriormente analizando estadísticamente los resultados. El inconveniente de este procedimiento es que habitualmente los recuentos obtenidos son muy bajos en los puntos de muestreo del agua purificada, pero habitualmente se encuentran recuentos en las aguas de alimentación y en los muestreos de las aguas de los puntos intermedios de los sistemas de purificación, que podrían ser útiles para este fin. Otra opción es filtrar grandes volúmenes de agua para obtener un recuento que permita la comparación.

Efectuar ensayos con distintos métodos es habitual y conveniente mientras un sistema de aguas está en etapa de validación.

Métodos para la investigación de microorganismos indicadores

Pseudomonas aeruginosa:

Cuando se especifica ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas, se refiere por lo general a la ausencia en 100 ml.

Este requerimiento es para aguas potables. Y a pesar de no estar indicado en aguas purificadas en las farmacopeas internacionales, su monitoreo podría ser realizado como prevención de formación de biofilms.

Por lo general el método que se emplea en aguas purificadas y potables es el recuento por el método de filtración de 100 ml de agua a través de una membrana de 0,45µm e incubación de la membrana sobre una

placa que contiene Agar Cetrimida solidificado. Sin embargo este medio de cultivo tiene la desventaja de ser inhibidor, y más aún si los microorganismos están injuriados por el contacto con hipoclorito agregado a las aguas potables para mantener su condición de potabilidad desde el punto de vista microbiano. Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimida son de color verdoso con pigmento que por lo general difunde en el agar por debajo de la membrana. Por este método las colonias pueden ser cuantificadas. Deben además ser identificadas ya que hay otras pseudomonas que pueden confundirse, como *P. fluorescens*, *B. cepacia*, *P. aerofasciens* o *P. putida*.

Sin embargo, como por lo general las especificaciones indican que *Pseudomonas aeruginosa* deben estar ausentes, la cuantificación no es necesaria.

Los autores hemos probado que el siguiente método es apto para el ensayo, aumentando las probabilidades de detectar la presencia de estas bacterias: El método consiste en la filtración de 100 ml de agua y posterior inmersión de la membrana en Caldo Tripticasa Soya. Luego de un mínimo de 3 días de incubación a 30-35°C, se efectúa el pasaje a Agar Cetrimida. El enriquecimiento previo permite la recuperación de las bacterias injuriadas y por lo tanto aumenta la detectabilidad en Agar Cetrimida, respecto del método de recuento antes citado.

Ensayos para coliformes totales y fecales

El término *Coliformes* se utiliza para aquellas bacterias Gram negativas, que son capaces de fermentar lactosa como única fuente de carbono y con producción de gas dentro de las 48 hs cuando se incuban a 35-37°C. La presencia de coliformes indicaría contaminación fecal lejana en el espacio o en el tiempo. En esta categoría entran algunos géneros de la Flia. Enterobacteriaceae, algunas de las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza y que no necesariamente son patógenas.

Escherichia coli es una bacteria perteneciente a esta familia que puede tener origen fecal, por lo que su presencia se considera indicador de contaminación fecal. Este organismo es bilis tolerante y puede desarrollar a 44°C.

Habitualmente el recuento de coliformes se determina empleando el método de Número más Probable (NMP), aunque también existen métodos por filtración a través de membrana (MF). Pero también puede ser suficiente el uso de métodos de Presencia / Ausencia (P/A).

(a) Método de Presencia-Ausencia: Es el método más simple que se utiliza cuando el recuento no es necesario. Se puede utilizar el Caldo P-A en simple, doble o triple concentración según la cantidad de muestra a agregar, descrito en la sección 9221.D ⁽²⁾.

Si embargo, una alternativa rápida es el uso de métodos Enzima-Sustrato, en el que se utiliza para la determinación de coliformes totales un sustrato cromogénico como o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) o Rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido (CPRG ó X-GAL), que se utilizan para detectar la presencia de la enzima β -D-galactosidasa, producida por los coliformes totales. Adicionalmente estos medios comerciales contienen un sustrato fluorogénico como MUG (4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide), que detecta la presencia de la enzima β -glucuronidasa, producida por *E. coli*, y que se detecta bajo luz UV. Estos medios comerciales se adquieren en sobres o ampollas del medio en polvo fraccionado listo para usar y se agregan directamente en forma aséptica a los 100 ml del agua a controlar, con posterior incubación durante 24-48hs a 30-35°C.

(b) Método NMP: La precisión del método depende del número de tubos empleado, y el recuento se obtiene empleando tablas que se establecieron considerando una distribución de Poisson. Como método presuntivo para la detección de coliformes totales puede emplearse Caldo Lauril Triptosa, distribuido en tubos en los cuales se coloca campanitas de Durham o pequeños tubos invertidos para detectar producción de gas a partir de la lactosa contenida en el medio. El medio puede contener Púrpura de Bromocresol (0.001g/l) como indicador para detectar la producción de ácido. Como método confirmatorio, el medio de los tubos positivos se repican en otros tubos conteniendo Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante, también con tubos de fermentación invertidos e incubando durante 18 hs a 35°C. Para la determinación del NMP de coliformes fecales, puede utilizarse el Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante

conteniendo MUG (4-methylumbelliferyl-beta-D- glucuronide) para detección de E. coli a $44.5^{\circ}\pm 0,2^{\circ}$ C.

(c) Método NMP empleando P-A: Alternativamente, y como ensayo más simplificado, el mismo medio comercial utilizado para el Método de Presencia – Ausencia puede utilizarse para efectuar una cuantificación, fraccionando los 100 ml en 5 tubos de 20 ml cada uno. En ese caso el NMP con el 95% de confianza para todas las combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan porciones de 20 ml de agua, para todos los posibles resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: NMP con el 95% de confianza para todas las posibles combinaciones de recipientes positivos y negativos con porciones de 20 ml de muestra

N° de tubos Positivos (20 ml/ tubo)	NMP/ 100 ml	Límites 95% Confianza	
		Menor	Mayor
0	<1,1	-	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,40	8,4
3	4,6	1,0	13
4	8,0	2,1	23
5	>8,0	3,4	-

El uso de este método puede ser suficiente para estimar la densidad de coliformes totales en la mayoría de las muestras de aguas, sin embargo, en caso de ser necesaria mayor precisión, o si se sospecha de un alto recuento de coliformes, otros métodos de NMP pueden ser hallados en bibliografía ⁽⁴⁾.

(d) Método de filtración por membrana (MF): Este método puede ser más reproducible y puede ser utilizado para muestras de mayor volumen. El método tiene limitaciones, sobre todo si el agua posee turbidez o cuando hay un alto recuento de bacterias no coliformes. Los medios de cultivo más utilizados para el recuento de coliformes totales son LES Endo Agar, en el que la membrana luego de la filtración se apoya sobre el medio de cultivo solidificado, o Caldo M-Endo, el cual impregna un *pad* estéril sobre el cual se apoya la membrana luego de la filtración. Una vez finalizada la incubación, al menos el 10% de las colonias desarrolladas sospechosas de coliformes, deben ser identificadas. El recuento se expresa directamente como UFC en el volumen de agua que fue filtrada.

Existen en el mercado otros medios de cultivo, algunos con MUG, pero se recomienda siempre utilizar el NMP como método comparativo antes de decidir utilizar cualquier método por filtración.

Identificación: Los métodos anteriores son sólo presuntivos, por lo que es necesario identificar los microorganismos sospechosos para establecer el género y en lo posible la especie. Pueden utilizarse métodos fenotípicos.

Establecimiento de límites y evaluación de resultados

Los límites de acción por lo general son los límites establecidos por farmacopeas o entidades según la calidad del agua y el uso que se le va a dar.

- *Límite de Acción* se define como un valor numérico que, una vez excedido, indica que el proceso está operando fuera de los parámetros normales.

- *Límite de Alerta* se define como un valor numérico que cuando es excedido indica que el proceso podría operar fuera de los parámetros normales.

Los Límites de Alerta deben ser establecidos de acuerdo a los resultados obtenidos en cada punto de muestreo de un sistema de aguas. Por lo general los resultados de los recuentos de las aguas de un sistema bajo control son nulos o muy bajos, por lo que debería utilizarse una distribución de Poisson para establecer los Límites de Alerta. Sin embargo, ante la dificultad del cálculo, se han buscado otras alternativas, entre ellas el cálculo de percentilos con el 95% de confianza de que los resultados obtenidos estén dentro de dicho límite de alerta. Los límites de alerta deben ser periódicamente evaluados (por ejemplo anualmente para incluir todas las estaciones). Para ello se estudian todos los recuentos obtenidos durante el periodo de evaluación y se calcula el percentilo 99% para evaluar si el sistema cumple con que estadísticamente el 99% de los resultados cumplen con el límite de acción (el percentilo hallado debe ser no mayor a dicho límite), y el percentilo 95% para determinar que estadísticamente el 95% de los resultados cumplen con el límite de alerta (el percentilo hallado debe ser no mayor a dicho límite). Durante la evaluación conviene evaluar tendencias y determinar cómo influyeron cambios que pudieron ocurrir durante el periodo de evaluación.

Los Límites de Alerta pueden ser variables, pero un cambio hacia un límite menos exigente debe ser justificado.

Métodos alternativos.

Además de los procedimientos que se describen en este capítulo, se puede aplicar al análisis del agua otros métodos rápidos microbiológicos (RMMs) como por ejemplo la Bioluminiscencia, Citometría de flujo y en fase sólida, la Epifluorescencia y la PCR entre otros. Estos métodos se detallan en el capítulo *Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos*, de Luis Jiménez, del presente manual.

Monitoreo del sistema de producción y distribución de agua de uso farmacéutico y cosmético

El agua no sólo es la materia prima más utilizada en muchos de los productos farmacéuticos y cosméticos, sino que además se utiliza para el lavado de los equipos de producción. Por lo general no se produce y fracciona en lotes, sino que la producción es continua, como también es continua la distribución generalmente a través de un loop o anillo. Es posible el monitoreo en línea de conductividad y de TOC, pero no es posible el monitoreo en línea de la calidad microbiológica del agua. Además el resultado del control microbiológico utilizando métodos tradicionales de cultivo se obtiene cuando el agua ya ha sido utilizada. Es importante resaltar que el agua es una fuente de multiplicación de una gran variedad de microorganismos y también los sistemas de producción y distribución de aguas o por falta de mantenimiento o por falta de diseño adecuado pueden dar lugar a la formación de biofilms muy difíciles de erradicar una vez instalados. Estas características hacen que la validación del sistema de aguas adquiera mayor importancia para asegurar que está bajo control.

El propósito del monitoreo del sistema de agua es:

- Asegurar la estabilidad y el control del proceso de todo el equipamiento de generación, almacenamiento y distribución del sistema, y el control de calidad para una asegurar que consistentemente se cumplen los requerimientos microbiológicos, de endotoxinas bacterianas y la pureza química del agua.
- Asegurar que el control de los parámetros críticos son adecuados para asegurar que pequeños cambios no afectan al sistema.
- Proveer la garantía de la efectividad de los procesos de mantenimiento, limpieza y sanitización.
- Los datos del monitoreo son capaces de identificar tendencias y un alerta temprano de desviación del estado de control y de aumento de la contaminación. ⁽⁶⁾

Salvo para el monitoreo del agua para inyectables (WFI), el cual debe ser diario, no existe una normativa que establezca la frecuencia del monitoreo microbiológico de aguas de uso farmacéutico, la frecuencia debe ser suficiente para asegurar que la calidad del agua cumpla con los criterios de aceptación según el tipo de agua y el uso que se le va a dar.

Investigación de resultados

Cuando los resultados del recuento de las aguas de uso farmacéutico están por encima del límite de acción preestablecido, o cuando se ha detectado presencia de microorganismos objetables o indicadores, o cuando se excede repetidamente el límite de alerta, una investigación debe ser realizada para determinar la causa del resultado obtenido. Habitualmente a esos resultados se los denomina OOT (*Out-of-trend*) ú OOL (*Out-of-limit*) ó MDD (*Microbiological Data Deviation*) y la investigación se efectúa de acuerdo a un procedimiento que ya debe estar preestablecido en un SOP (Standard Operation Procedure) o POE (Procedimiento Operativo Estándar). Ver el capítulo correspondiente a *Desviación de los resultados microbiológicos* en el presente manual.

La interpretación e investigación de los resultados del análisis microbiológico de aguas puede ser dificultosa debido a:

- La formación de biofilms, que puede desprenderse parcialmente en forma discontinua, obteniéndose recuentos erráticos, que no siguen una tendencia.
- Por lo general el sistema de aguas opera en forma continua, y no hay un lote definido.
- Es posible que en el sistema en diferentes momentos durante el día haya cambios de temperatura, concentración de ozono -si lo hubiera-, cantidad de agua utilizada o caudal de agua que se repone, u otra variable que pueda afectar a la calidad microbiológica del agua en algún punto de muestreo.
- Las muestras de agua no pueden conservarse hasta obtener el resultado – utilizando los métodos tradicionales con medios de cultivo-, por lo que no es posible el reanálisis de una muestra similar a la original.

Por los motivos antes citados, cuando se realiza una investigación de un resultado de aguas, y no es posible volver a obtenerlo, es deseable que la investigación implique el muestreo en otros puntos de muestreo y en varios momentos del día.

Como no se espera el resultado del monitoreo del agua para ser utilizada, la investigación debería también incluir el control de los productos que se elaboraron o de los equipos que se lavaron con el agua, y su muestreo si corresponde.

La investigación también debe incluir la identificación de los microorganismos, inclusive de los obtenidos en los recuentos, y de controles de los materiales o productos que pudieron haber sido afectados.

Garantía Calidad en el laboratorio

Los resultados obtenidos del análisis del agua deben ser confiables, para lo cual el laboratorio debe contar con instalaciones apropiadas, personal con un nivel adecuado de entrenamiento tanto en el muestreo como en el análisis, y un microbiólogo experimentado a cargo.

En el laboratorio deben efectuarse controles de calidad de todos los lotes de los medios de cultivo empleados y de los sistemas o kits de identificación microbiana, calificaciones de las incubadoras y de las heladeras, validaciones de los ciclos de esterilización, control periódico de los filtros HEPA y calibración de todos los instrumentos de medición.

El laboratorio debe contar con procedimientos escritos adecuados para todas las tareas que se realizan, incluyendo los procedimientos de limpieza, desinfección y/o mantenimiento de áreas y equipos y de lavado de materiales reusables, y los procedimientos escritos para los análisis de las aguas.

Los medios de cultivo deben ser elaborados con Agua Purificada que cumpla con los requisitos físico químicos de Agua Purificada y con un recuento total de no más de 10^3 UFC/ ml ⁽²⁾.

Cálculo de la precisión de los analistas ⁽²⁾: Para poder promediar los resultados de las placas duplicadas de recuentos, la diferencia máxima que debe haber entre los recuentos leídos debe ser establecida.

Una manera de establecer esa diferencia es recolectar los resultados obtenidos, siempre que los recuentos no sean cero, de al menos 15 análisis de aguas, y registrarlos en una tabla según el ejemplo de la Tabla 2, como D1 y D2. Calcular luego el logaritmo de ambas lecturas, que se registran como L1 y L2. Calcular luego el rango

R, que es la diferencia entre L1 y L2 sin el signo.

Otra manera es preparar muestras de agua inoculando una suspensión bacteriana (por ejemplo *P. aeruginosa* por ser típico de aguas), de modo de obtener menos de 100 UFC/ placa.

Tabla 2. Ejemplo de tabla de cálculo.

D1	D2	L1	L 2	R
36	40	1,5563	1,60206	0,046
27	40	1,43136	1,60206	0,171
26	27	1,41497	1,43136	0,016
35	38	1,54407	1,57978	0,036
...	...	...	...	...

Calcular luego el promedio de todos los rangos $\bar{R}$, y luego calcular el *Criterio de precisión* multiplicando dicho promedio por el valor 3.27. Efectuar ese cálculo para cada analista.

Promedio de los rangos:
$$\bar{R} = \frac{\sum R_i}{i}$$

Criterio de precisión:
$$\bar{R} \times 3.27$$

Este resultado deberá ser menor que un valor (criterio de aceptación) que se debe establecer en el laboratorio. Un valor adecuado puede ser *no más de 0.3*. Este valor surge de un valor comúnmente aceptado que la diferencia entre duplicados de un recuento microbiológico debe ser no más de 0.3 log. Un criterio de aceptación más estricto también puede ser empleado

Si un analista excede el criterio pre-establecido, no debe realizar recuentos hasta que no esté debidamente entrenado para ello, y que cumpla con un nuevo ensayo de precisión.

Bibliografía

1. Código Alimentario Argentino. http://www.anmat.gob.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf
2. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. APHA. AWWA. WEF.
2. United States Pharmacopeia. USP. <1231> *Water for Pharmaceutical Purposes*.
3. European Pharmacopea (Eur. Ph)
5. FDA. *Guide to inspections of High Purity Water Systems*. July 1993.
6. Dilip Ashtekar. *Monitoring of Microbiological Quality Attributes of Water for Pharmaceutical Use*. Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices. Business Horizons Pharmaceutical publishers. 1st edition 2011.

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 17 especies ⁽²⁾.

Los miembros del cBc se hallan ampliamente distribuidos en el ambiente. Sin embargo, en los últimos años 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 y clasificación del cBc; y por otro el sanitario, en el cual establecer medidas de control para prevenir contaminaciones e infecciones causadas por estos microorganismos 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 sobre estos microorganismos, 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 a 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, *Burkholderia 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 siete 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* y *B. lata*.

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 particular 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⁾.

En cuanto al tamaño, todas las especies del cBc analizadas poseen entre 6 a 9 Mb y son unos de los más largos encontrados 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 difiere aunque todas contienen genes que indican que derivan de elementos móviles como transposones, plásmidos y bacteriófagos ⁽²⁴⁾.

- **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^(28,29), 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 ^(29, 30, 31).

- **Resistencia a antimicrobianos:** La resistencia de los miembros del cBc está documentada principalmente frente a antibióticos ⁽³²⁾ pero también existen reportes de resistencia frente a los desinfectantes ^(30, 31, 33). 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, 34).

Además de la capacidad de formar biopelículas descrita 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 ⁽³⁵⁾. También fueron descritos mecanismos de resistencia a β -lactámicos en algunas cepas ⁽³⁶⁾. Por otro lado, está estudiada la existencia de una bomba de flujo en la membrana externa que expulsa activamente cloranfenicol, trimetoprima y quinolonas ⁽³⁵⁾, y la presencia de una enzima dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprima ⁽³⁷⁾.

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 ⁽³²⁾.

Los múltiples efectos del cBc

Dadas las particulares características, se han descrito 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, 38).

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⁾.

Burkholderia 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 inocuidad 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, 39). Dentro de este grupo, los pacientes fibroquísticos (FQ), son particularmente afectados ⁽⁴⁰⁾. 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, 39).

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" ⁽⁴⁰⁾. 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, 41). Estos datos pueden variar según el país ^(42, 43). En Argentina, entre los años 2000 y 2010, *B. contaminans* fue la especie más frecuentemente aislada tanto de pacientes FQ como no FQ ⁽⁴⁴⁾.

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* ^(45, 46), 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 trasplante, los pacientes infectados con *B. cenocepacia* son excluidos de las listas de trasplante pulmonar ⁽⁴⁷⁾.

Todos los miembros del cBc son, en mayor o menor medida, resistentes a la mayoría de los antibióticos ⁽³²⁾. 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 ⁽⁴⁸⁾. 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, 49). A partir de ello, se ha impulsado la toma de 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 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.

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 ⁽⁵⁸⁾. 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.

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

Producto	Lugar	Año	Referencia bibliográfica
Emulsión corporal	España	2006-2007	50
Emulsión de lípidos para nutrición parenteral	Francia	2001-2002	51
Gel para ecografía	Canadá	1992-2005	52
Solución para infusión endovenosa	EEUU	2005	53
Catéter para hemodiálisis	Italia	2005	54
Salbutamol	Arabia Saudita	2006	55
Enjuague bucal	EEUU	1996-1998	56
Spray nasal de clorhidrato de oximetasonina	EEUU	2004	57

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, excepto *B. lata* también fueron halladas en pacientes de nuestro país ⁽⁴⁴⁾.

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 ^(31, 33). 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 ⁽³¹⁾. El agua a más de 65°C 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 ⁽³⁰⁾. Sin embargo no esta 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/cm². 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 ⁽⁴⁴⁾.

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 hs a 30°C, 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 ⁽³⁴⁾ y con metil y propilparabeno ⁽⁵⁹⁾. En ambos casos se indica además la capacidad de los microorganismos de usar dichos conservadores como fuentes de carbono. También se ha descrito la capacidad de adaptación de cepas del cBc

al ácido benzoico, al formaldehído y a imidazolidinil urea ^(60, 61).

El uso de microorganismos del cBc no está contemplado en los ensayos de desafío para conservadores codificados en Farmacopeas. Algunas publicaciones como *Cosmetic and Drug Microbiology* ⁽⁶²⁾ o el *Handbook of Biocide and Preservative Use* ⁽⁶¹⁾ 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 ⁽³³⁾.

De los microorganismos especificados en las Farmacopeas para realizar los ensayos de desafío, *Pseudomonas aeruginosa* es aquel que se encuentra taxonómicamente más cercano al cBc. A partir de esto, podría suponerse similitud de comportamiento del cBc con *Pseudomonas aeruginosa* frente a los conservadores. Ensayos comparativos realizados en nuestro laboratorio, demostraron que los miembros del cBc expresan mayor resistencia que *Pseudomonas aeruginosa* frente a un gran número de conservadores cuando son evaluados en medios con escasa cantidad de nutrientes ⁽⁴⁴⁾. 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 *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁴⁴⁾. 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 ^(63, 64).

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 30°C por no menos de 48 hs.

Por otro lado, existen diversos medios selectivos para el aislamiento del cBc. El agar BCSA selectivo para *Burkholderia cepacia* ⁽⁶⁵⁾ es el medio más empleado. Principalmente recomendado 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) ⁽⁶⁶⁾ o el medio PCAT (con ácido azelaico y triptamina) ⁽⁶⁷⁾. 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 *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁴⁴⁾.

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, 64) 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 *Burkholderia 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 ⁽⁴⁴⁾.

Existe una prueba en base a un medio con glucosa y arginina para la discriminación de *Pseudomonas aeruginosas* y otros microorganismos ⁽⁶⁸⁾, que fue recomendado recientemente como una herramienta útil para disminuir el número de falsos positivos que desarrollan en los medios selectivos para el cBc ⁽⁶⁹⁾. 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°C 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 30° C por no menos de 48 hs
- Aislamiento en agar BCSA, incubación a 30° 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 Tripteína Soja, incubarlo 24 - 48 hs a 30°C 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%.

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. Vanlaere E, A Baldwin, D Gevers, D Henry, E De Brandt, JJ LiPuma, E Mahenthiralingam, D Speert, C Dowson, P Vandamme. (2009). Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:102-111.
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. Conway BD, V Venu, D Speert. (2002). Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 184:5678-5685.
 29. Cunha MV, SA Sousa, JH Leitão, LM Moreira, PA Videira, I Sá-Correia. (2004). Studies on the involvement of the exopolysaccharide 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.
 30. 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.
 31. Peeters E, H Nelis, T Coenye. (2008). Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *J Hosp Infect* 70:361-368.
 32. 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.
 33. Rose H, A Baldwin, C Dowson, E Mahenthiralingam. (2009). Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Antimicrob Chemother* 63:502-510.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Chiesa C, P Labrozzi, S Aronoff. (1986). Decreased baseline β -lactamase production and inducibility associated with increased piperacillin susceptibility of *Pseudomonas cepacia* isolated from children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 20:1174-1177.
 37. Burns J, D Lien, L Hedin. (1989). Isolation and characterization of dihydrofolate reductase from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1247-1251.
 38. 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.
 39. Speert D (2001). Understanding *Burkholderia cepacia*: epidemiology, genomovars and virulence. *Infect Med*

40. 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.
41. LiPuma JJ, T Spilker, LH Gill, P Campbell, L Liu, E Mahenthiralingam. (2001). Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 164:92-96.
42. Campana S, G Taccetti, N Ravenni, F Favari, L Cariani, A Sciacca, D Savoia, A Collura, E Fiscarelli, G De Intinis, M Buseti, A Cipolloni, A d'Aprile, E Provenzano, I Collebrusco, P Frontini, G Stassi, M Trancassini, D Tovagliari, A Lavitola, C Doherty, T Coenye, JR Govan, P Vandamme. (2005). Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. *J Clin Microbiol* 43:5136-5142.
43. Cunha MV, A Pinto-de-Oliveira, L Meirinhos-Soares, M Salgado, J Melo-Cristino, S Correia, C Barreto, I Sá-Correia. (2007). Exceptionally high representation of *Burkholderia cepacia* among *B. cepacia* complex isolates recovered from the major portuguese cystic fibrosis centre. *J Clin Microbiol* 45:1628-1633.
44. Degrossi J, M D'Aquino. (2010). El complejo *Burkholderia 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. LiPuma JJ, T Spilker, T Coenye, C Gonzalez. (2002). An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. *Lancet* 359: 2002-2003.
50. Alvarez-Lerma F, E Maull, R Terrada, C Segura, I Planeéis, P Coll, H Knobel, A Vazquez. (2008). Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care* 12:R10.
51. Doit C, C Loukil, A Simon, A Ferroni, J Fontan, S Bonacorsi, P Bidet, V Jarlier, Y Aujard, F Beauflis, E Bingen. (2004). Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in a pediatric hospital due to contamination of lipid emulsion stoppers. *J Clin Microbiol* 42:2227-2230.
52. 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.
53. Held M, E Begier, D Beardsley, F Browne, R Martinello, R Baltimore, L McDonald, B Jensen, J. Hadler, L Dembry. (2006). Life-threatening sepsis caused by *Burkholderia cepacia* from contaminated intravenous flush solutions prepared by a compounding pharmacy in another state. *Pediatrics* 118:212-215.
54. 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.
55. 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.
56. Molina-Cabrillana J, M Bolaños-Rivero, E Alvarez-León, A Sánchez, M Sánchez-Palacios, D Alvarez, 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.
57. CDC Morbidity and Mortality weekly report. Marzo 26, 2004.
En <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5311a8.htm>.
 58. Sutton S. (2006). Microbial Limits Tests The Difference Between “Absence of Objectionable Microorganisms” and “Absence of Specified Microorganisms”. *PMF Newsletter* 12 (6): 3.
 59. Close JA, P Nielsen. (1976). Resistance of a Strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p- Hydroxybenzoic acid. *Appl Environ Microbiol.* 31: 718–722.
 60. Borovian, G.E. (1983). *Pseudomonas cepacia*: growth in and adaptability to increased preservative concentrations. *J Soc Cosmet Chem.* 34:197-203
 61. Rossmore HW.(1995). Handbook of biocide and preservative use. Blackie Academic & Professional (Eds). Glasgow.
 62. 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.
 63. 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.
 64. van Pelt C, C Verduin, W Goessens, M Vos, B Rummeler, 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.
 65. 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.
 66. 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.
 67. Burbage DA, M Sasser. (1982). A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 72:706.
 68. Stewart DJ. (1971). A composite arginine glucose medium for the characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram negative bacilli. *J Appl Bacteriol* 34:779-86.
 69. 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.

Monitoreo ambiental

Alejandra Vázquez y Claudio Denoya

- *Introducción*
- *Importancia de un programa de monitoreo microbiológico para ambientes controlados*
- *Objetivos de un programa de monitoreo microbiológico*
- *Programa de monitoreo microbiológico dentro del programa general de monitoreo ambiental*
- *Monitoreo de manufactura y áreas de ensayo de esterilidad*
- *Monitoreo de áreas no productivas, de soporte, o del laboratorio de ensayos de esterilidad.*
- *Niveles de alerta y acción*
- *Caracterización de los microorganismos aislados*
- *Aisladores para realizar el ensayo de esterilidad o procesos asépticos*
- *Tendencias*
- *Entrenamiento del personal*
- *Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en el aire. Métodos tradicionales.*
- *Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en superficie. Métodos tradicionales.*
- *Métodos No Tradicionales y Rápidos para el Monitoreo Ambiental Microbiológico*
- *Conclusiones*
- *Bibliografía*

Introducción ^[1-7]

La manufactura de medicamentos y de dispositivos médicos utilizados en forma directa en pacientes requiere la aplicación de estrictas normas de control definidas en numerosas publicaciones provenientes de entes nacionales e internacionales. Varios factores deben tenerse en cuenta; un grupo de profesionales competentes y especializados, capaces de definir las áreas críticas de manufactura y las medidas de control adecuadas para asegurar la producción de medicamentos satisfaciendo los más altos niveles de seguridad para el paciente, el establecimiento de un programa adecuado de toma de muestras, obtención de los datos de control e interpretación correcta de los resultados, como así también la implementación de un sistema de seguimiento de datos a través del tiempo (estudio de tendencias).

El programa de monitoreo microbiológico ambiental, uno de los elementos críticos en el proceso de producción, debe ser aplicado en forma rutinaria y periódica (semanalmente, mensualmente, etc.) y los datos deben ser obtenidos por técnicos adecuadamente entrenados usando instrumentos controlados y medios de cultivos preparados y probados de acuerdo con las normas de control de calidad vigentes.

Finalmente, se deben establecer límites para cambios o aumentos significativos en el número de unidades formadoras de colonias encontradas en el ambiente (niveles de alerta y de acción).

Estos límites de acción y alerta deben establecerse después de acumular suficientes datos a lo largo de un periodo extenso de monitoreo (idealmente incluyendo cuatro cambios estacionales o un año completo).

Es muy importante contar con procedimientos escritos que detallen los pasos a tomar en caso que estos límites sean excedidos, como así también efectuar una investigación adecuada incluyendo la caracterización del microorganismo (resultado del Gram, morfología de colonia e identificación), y contar con una lista de acciones correctivas y de prevención para eliminar el problema de contaminación.

Los métodos más comunes de monitoreo ambiental, y en particular los microbiológicos están resumidos en las Tablas 1 y 2. Las secciones siguientes en este capítulo están dedicadas a una discusión más detallada de los conceptos generales mencionados en esta introducción.

Tabla 1. Programas de Monitoreo Ambiental

Componente	Comentarios
Agua	Es el material básico más utilizado en la formulación, procesamiento y producción de productos farmacéuticos. El control microbiológico del agua es uno de los componentes esenciales del monitoreo ambiental.
Gases a presión	Aire, gas, nitrógeno a presión, y todos los elementos asociados (compresores, tubos, etc.) deben ser monitoreados periódicamente.
Aire	Este monitoreo incluye detección de partículas viables y no viables.
Superficies	Este monitoreo requiere el uso de medios de cultivo y toma de muestra apropiados para los diferentes tipos de superficies.
Operarios	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y manos por impresión de dedos sobre placas de agar.

Tabla 2. Monitoreo Microbiológico

Muestra	Método	Instrumentación y/o Referencia
Aire	Impacto sobre agar	Surface Air System (SAS) y Reuter Centrifugal Sampler (RCS)
	Placas y Frascos de Sedimentación	Placas de Petri de 90 mm de diámetro y 14mm de altura con tapa, preferentemente de poliestireno cristal, esterilizadas por radiación gamma. Pueden obtenerse listas para usar conteniendo el agar o llenarse en forma aséptica en el laboratorio de uso. En forma similar se pueden usar frascos con medio líquido.
Superficies	Hisopado	Pueden ser simplemente hisopos de distintos materiales o kits comerciales que incluyen hisopos más medios de transporte y crecimiento.
	Placa de Contacto	Pueden ser de preparado local, listas para usar o kit comerciales que proveen la placa y el vial con el medio líquido de cultivo elegido.
	Lavado	Este método permite la toma de muestras de gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente.
Operarios	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y manos por impresión de dedos sobre placas de agar	Este monitoreo permite evaluar el nivel de destreza en técnicas asépticas por parte del personal especializado en manufactura de productos farmacéuticos.

Importancia de un Programa de Monitoreo Microbiológico para Ambientes Controlados ^[1-5]

El monitoreo del número total de partículas, aun cuando se realice con instrumentación electrónica sobre una base continua, no provee información sobre el contenido microbiológico de ese ambiente. La limitación básica de los contadores de partículas es que ellos miden partículas de un tamaño 0,5 µm o mayor. Los microorganismos ambientales generalmente no se encuentran flotando en el aire libremente o en células simples e independientes, sino que se encuentran agrupados, asociados con partículas de 10 a 20 µm. Más aun, los contadores tradicionales no diferencian entre partículas inertes y microorganismos (células y esporas) flotando en el aire.

El conteo de partículas y el conteo de microorganismos viables dentro de ambientes controlados varían con la localización del muestreo y las actividades que se están desarrollando durante el monitoreo.

Algunas de las características más importantes a tener en cuenta en un programa de monitoreo microbiológico son las siguientes:

1. El programa de monitoreo microbiológico para ambientes controlados debe evaluar la efectividad de las prácticas de limpieza y sanitización realizadas por el personal, que podría tener un impacto en la carga biológica del ambiente.
2. El programa de monitoreo microbiológico de rutina debe proveer suficiente información para asegurar que el ambiente durante la manufactura está operando dentro de un adecuado estado de control.
3. El monitoreo microbiológico ambiental y el análisis de los datos, por personal calificado, permitirá saber que el estado de control del medio ambiente de manufactura se mantiene bajo control a través del tiempo. El ambiente debe ser muestreado durante una operación normal para permitir la colección de datos significativos. Los muestreos deben ocurrir con los materiales en el área, las actividades de los procesos en funcionamiento, y el personal en su puesto de trabajo y en actividad.
4. El monitoreo, cuando aplique, deberá incluir cuantificación de los muestreos de aire en los cuartos, del aire comprimido que entre a áreas críticas, superficies, equipos, recipientes contenedores, pisos, paredes y ropa del personal.
5. El objetivo del programa es obtener una estimación representativa de la bio-carga del ambiente. Cuando se cuente con un número representativo de datos, se analizarán y se evaluarán tendencias de los mismos por parte de personal entrenado en el tema. Así como es importante revisar los resultados con una frecuencia corta periódica determinada, también es crítico revisarlos con una base extendida para ver si hay tendencias. Las tendencias pueden ser visualizadas mediante la construcción de cartas de control estadístico que incluyan niveles de alerta y acción.
6. Cuando se excedan los niveles, debe revisarse la documentación relacionada y realizarse una investigación. La investigación debe incluir la revisión de la documentación del mantenimiento del área, documentos de sanitización, parámetros operacionales y físicos, tales como humedad relativa y temperatura de los cuartos implicados, como así también el estado de entrenamiento del personal involucrado. Las acciones a tomar como consecuencia de la investigación pueden ser tales como reforzar el entrenamiento del personal, enfatizar el control ambiental de algunos cuartos, muestreos adicionales, incremento de la frecuencia de controles, aumento del número de producto a analizar, identificación de los microorganismos involucrados y sus posibles fuentes, evaluación de la necesidad de re-evaluar los actuales procedimientos estándar y su re-validación, si fuera necesario. La investigación y el racional que avalen las acciones a tomar deben ser documentados e incluidos como parte del sistema de gerenciamiento de la calidad.
7. Un ambiente controlado es definido por certificación correspondiente a una operación estándar. Los parámetros que son evaluados incluyen integridad de filtros, velocidad del aire, patrones de aire, renovaciones de aire, presiones diferenciales. Estos parámetros pueden afectar la bio-carga microbiológica del ambiente. El diseño, construcción, y las operaciones, pueden variar mucho entre distintas empresas, haciendo difícil generalizar requerimientos para estos parámetros.

Tabla 3. Referencias regulatorias

Referencias Regulatorias	Contenido
Código de Regulaciones Federales Título 21 (21 CFR Part 211) USA ^[9]	El Título 21 (Alimentos y Drogas), Parte 211 (Prácticas de buena producción de productos farmacéuticos [<i>“Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals”</i>]) del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica describe en sus diferentes secciones los requerimientos a seguir en la manufactura de productos medicinales. Algunas de la secciones siguientes son de importancia para el monitoreo ambiental, y para el microbiológico en particular (ver a continuación)
21 CFR 211.113 (a) (b)	Esta sección del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica está dedicada al control de la contaminación microbiológica estableciendo la necesidad de contar con procedimientos escritos apropiados que definan la prevención de microorganismos “objetables” en los medicamentos no estériles, y de contaminación microbiológica general en los medicamentos estériles.
21 CFR 211.46	Esta sección está dedicada a la calidad del aire, sistemas de ventilación (HVAC) filtración, calentamiento y refrigeración, diferencias de presión, cantidad o ausencia de microorganismos, partículas, humedad y temperatura, requeridos en el área de producción de medicamentos.
<i>Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report No. 13</i> ^[10-11]	El PDA <i>Technical Report</i> No.13, “ <i>Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program</i> ” detalla los métodos de monitoreo y el modo de establecer límites de alerta y acción y cómo reportar resultados
<i>PhRMA Task Force Report on Environmental Monitoring in Non-Sterile Manufacturing Areas</i> ^[12]	Una referencia útil que define las prácticas más básicas del monitoreo ambiental para la manufactura de productos no-estériles y la frecuencia con que se deben tomar muestras del medio ambiente.
Disposición 2372/08. ANMAT .Argentina ^[6-7] “Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos” y la “Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación”.	Anexo I : “Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos” en el Capítulo 10 : Producción. Ítem: Operaciones - Productos estériles - Se indica la necesidad de: <i>Procedimientos operativos para el control microbiológico de áreas limpias y controles ambientales en dichas áreas a intervalos predefinidos. Monitoreo microbiológico de áreas donde se realicen operaciones asépticas y existencia de los registros correspondientes.</i> En el Anexo II “Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación”. Ítem Inhibición de la línea / área / lote. Se procederá a la inhibición cuando: <u>PRODUCCION- Productos no Estériles:</u> Falte monitoreo microbiológico y ambiental en áreas donde se elaboran productos no estériles cuando el producto lo requiere. <u>PRODUCCION - Productos Estériles:</u> Falte monitoreo microbiológico y ambiental en áreas donde se elaboran productos estériles. Falte monitoreo microbiológico y ambiental en cada operación aséptica. Ambientes no clasificados y no controlados donde falte monitoreo de microorganismos viables durante la elaboración de productos de llenado aséptico. Uso de vestimenta no exclusiva en las áreas de ambiente controlado.

Objetivos de un Programa de Monitoreo Microbiológico

En general, el propósito de un programa de monitoreo microbiológico incluye los siguientes puntos [8]:

- Provee información crucial sobre la calidad del medio ambiente durante la manufactura.
- Previene contaminaciones microbianas durante las futuras campañas de manufactura gracias a la detección de cambios significativos en la presencia bacteriana durante los estudios de seguimiento.
- Previene la liberación de lotes de producto potencialmente contaminados que no cumplen con los estándares establecidos.
- Previene el riesgo de una infección del paciente que recibe un producto farmacéutico contaminado.
- Asegura la implementación de controles de monitoreo ambiental en las diferentes áreas de producción.
- Provee un panorama de la limpieza de los ambientes de producción sirviendo como una herramienta para medir la efectividad de las medidas sanitarias adoptadas en la planta de manufactura.

Un programa de monitoreo microbiológico debe también cumplir con requerimientos definidos en diferentes documentos regulatorios como se detallan en la Tabla 3.

Programa de monitoreo microbiológico dentro del programa general de monitoreo ambiental [1-5]

El programa de monitoreo microbiológico es uno de los elementos más críticos del monitoreo ambiental. Este programa es responsabilidad del área de control de calidad. Tendrá una frecuencia y alcance que dependerá del riesgo de contaminación microbiológica involucrado en la actividad.

El programa de monitoreo debe realizarse cumpliendo con los requisitos gubernamentales y las agencias regulatorias. El sistema debe incluir:

- Medios de cultivo calificados capaces de cumplir con la detección de bacterias y hongos y asegurar la detectabilidad de los microorganismos después de la condiciones de exposición y a través de la vida útil del medio.
- Requerimientos para el flujo del personal, equipos y materiales de áreas monitoreadas, como así también, accesos controlados de personal a cuartos críticos.
- Sistema apropiado de almacenamiento de equipos cuando no se usan.
- Procedimientos escritos indicando los lugares de muestreo con un grado de precisión tal que permita muestreos reproducibles.

El plan de muestreo debe indicar:

- Frecuencia del muestreo.
- Momento en que las muestras son tomadas,
- Duración del muestreo.
- Tamaño de la muestra.
- Lugares donde se toma la muestra (visualizados en un plano)
- Técnica y equipo de muestreo. Los equipos de muestreo de aire activos deben ser tales que sean aptos para trabajar en ambientes asépticos, con muestreos eficientes, limpios, sin interrupción del flujo de aire y capaces de ser esterilizados.
- Niveles de alerta y acción.

- Respuesta apropiada frente a desviaciones a los niveles de alerta y acción.
- Clasificación de áreas.
- Requerimiento para la identificación de las aislaciones.
- Requerimiento para los estudios de tendencias.

El plan de muestreo debe ser justificado con datos que lo soporten.

Aquellas áreas que hayan perdido temporalmente su estado de “bajo control microbiológico” debido a un evento esperado o no, deben tener un procedimiento y/o control de cambio para retornar a su estado controlado.

Para áreas con presiones diferenciales debe haber monitoreo al menos en cada turno en cuartos de llenado, áreas asépticas y áreas perimetrales a las controladas. Las presiones diferenciales de aire deben ser monitoreadas antes y después de completados los testeos de esterilidad.

La recuperación normal de presiones diferenciales entre cuartos debe ser determinada con un mecanismo que responda a las excursiones.

Establecimiento de un Sistema de Clasificación de Áreas de Producción:

Las áreas de soporte y las áreas críticas de operaciones de producción y las de análisis de ensayos de esterilidad deben ser calificadas cuando aplique. Esta calificación debe ser soportada por datos microbiológicos y de partículas obtenidos durante los estudios de calificación.

La clasificación de áreas debe generar datos en condiciones de descanso (sin operación) y en condiciones dinámicas (en operación).

Excursiones/ Acciones correctivas/ Plan de remediación:

Cada compañía debe definir claramente las circunstancias bajo las cuales deben aplicarse un plan de acciones correctivas/remediación y documentar cuando el área ha vuelto a estado de control.

Monitoreo de manufactura y áreas de ensayo de esterilidad. [1-5]

El monitoreo del área de manufactura debe realizarse en condiciones dinámicas. Los monitoreos en condiciones de descanso pueden realizarse cuando sea parte de un proceso de estudio de la eficiencia del monitoreo o seguimiento del mismo, o cuando alguna guía regulatoria lo disponga.

Los equipos de monitoreo de tipo cuantitativos deben tener en cuenta el volumen de aire tomado/ superficie barrida. Algunos expertos indican que las placas de sedimentación sería conveniente dejarlas para cuando sean solicitadas por algún agente regulador o para estudios no cuantitativos.

Cada compañía deberá definir la criticidad de sus operaciones y el lugar donde estos procesos se realizan. Las frecuencias de muestreos, los lugares, el tiempo debe ser establecido en función de las operaciones que se realizan. Los lugares son elegidos teniendo en cuenta el riesgo de contaminación del producto.

El monitoreo de superficies y de partículas viables en el aire debe ser lo más próximo a la operación crítica, pero sin por ello interferir con la protección del producto.

Una evaluación debe ser llevada a cabo para determinar si es necesario la investigación de microorganismos anaeróbicos.

La temperatura y humedad relativa deben ser monitoreadas con la frecuencia según corresponda a la operación realizada.

Los monitoreos relacionados con la producción incluyen:

- Monitoreo de todas las operaciones asépticas.

- Muestreo de partículas viables y no viables en el aire, muestreo de superficies y del personal.
- Monitoreo de los sitios de llenado.
- Monitoreo de viable en forma continua mediante placas de sedimentación que se extiendan desde el inicio hasta el final de la operación.
- Monitoreo activo de viables en forma intermitente, reflejando la longitud de la operación al menos una vez por turno. Cuando los equipos de muestreo activo de viables pudieran afectar la zona de protección de cabinas de seguridad biológica o flujos laminares, realizar estos controles antes y después del llenado, pero no durante esta operación.

Los guantes y la ropa del personal que trabaja en área aséptica críticas deben ser monitoreados. El lugar, la frecuencia y el número de muestras debe ser definido en base al riesgo de contaminación, pero se sugiere al menos un monitoreo de dedos de cada guante por cada turno y el control de ropa al menos con base diaria. Es importante asegurar que los guantes no hayan sido sanitizados antes del muestreo, como así también que no queden trazas de medios de cultivo en los guantes muestreados.

Monitoreo de áreas no productivas, de soporte, o del laboratorio de ensayos de esterilidad. ^[1-5]

La frecuencia y lugar de muestreo se determina en función de la clasificación del área, uso y diseño de las instalaciones. Los controles incluyen monitoreo de viables y no viables en el aire, muestreo de superficies y del personal.

Las áreas que no son activamente de procesos de esterilidad ni de dichos ensayos deben ser regularmente, limpiadas, sanitizadas y monitoreadas.

Selección de los sitios de muestreo ^[11]

Cada proceso debe ser cuidadosamente evaluado cuando se seleccionan los sitios de muestreo. El objetivo del muestreo es proveer datos que sean útiles para ayudar a identificar problemas de contaminación actuales o potenciales asociados con procedimientos específicos, equipos, materiales, procesos. Se debería muestrear aquellos lugares que de contaminarse, contaminarían el producto. Sin embargo, puede ser prudente seleccionar sitios próximos pero no en contacto con el producto.

Algunas preguntas que nos pueden ayudar a seleccionar los sitios de muestreo serían:

- ¿A cuáles sitios una contaminación microbiológica podría afectar adversamente la calidad del producto?
- ¿Cuáles sitios tendrían mayor probabilidad de alta proliferación microbiológica durante en el actual proceso de producción?
- ¿La selección debería involucrar un diseño estadístico (por ejemplo, Federal Standard 209E)?
- ¿Deberían algunos sitios de monitoreo ser rotados?
- ¿Cuáles sitios son los más inaccesibles o difíciles de limpiar, sanitizar o desinfectar?
- ¿Qué actividades en el área contribuyen a dispersar la contaminación?
- ¿Podría el acto de muestreo generar disturbios ambientales que generaran datos erróneos o contaminar el producto?
- ¿Debería el muestreo realizarse exclusivamente al final del turno?

Fuentes en contacto con el producto puede ser muestreados, por ejemplo: gases comprimidos, aire de los cuartos, equipos de manufactura, herramientas, superficies críticas, contenedores de almacenamiento, cintas transportadoras, guantes del personal, agua. Entre las fuentes de no contacto con el producto podemos citar: paredes, pisos, techos, puertas, sillas, pass-through.

Frecuencia de muestreo ^[11]

Los requerimientos de muestreo pueden variar dependiendo de factores tales como tipo de proceso de manufactura y tipo de producto, diseño de las instalaciones, cantidad de recurso humano interviniente, tipo de esterilizaciones involucradas, tipo de liberaciones (mediante test de esterilidad o paramétricas), perfiles históricos de datos de monitoreo ambiental. Cambios en la frecuencia, temporarios o permanentes, puede ser necesario en base a cambio de prácticas, requerimientos de compendio, desarrollo de tendencias, adquisición de nuevos equipos, o construcción de nuevas áreas o utilidades. La clave para la correcta elección de la frecuencia de monitoreo es poder identificar potenciales deficiencias del sistema.

Antes de implementar una reducción en la frecuencia de muestreo, el personal de Aseguramiento de la Calidad deberá estudiar el resumen de los datos históricos junto con la actual frecuencia de muestreo y la nueva propuesta. Después de un tiempo de implementada la nueva frecuencia deberá estudiarse si el cambio fue apropiado.

Niveles de alerta y acción ^[1-5 y 11]

Los niveles de alerta y acción se establecen para áreas calificadas. Niveles de alerta y acción deben ser determinados e incluir límites para el monitoreo del personal.

La importancia del resultado individual de cada muestra surge de compararla con los límites de alerta y acción establecidos. El promedio de resultados de un mismo lugar de muestreo sólo es posible cuando se realizan tendencias. No es posible promediar resultados individuales de distintos lugares de muestreo.

El nivel de alerta se establece en base al análisis de datos históricos. Los niveles de acción se inician basándose en guías regulatorias y posteriormente en base a los análisis de datos propios históricos cuantificables. Los niveles de alerta y acción deben tener su justificación estadística.

Una re-evaluación anual de los niveles de alerta y acción debe realizarse y documentarse.

Dado que no hay consenso acerca del mejor mecanismo para establecer niveles, los siguientes son aproximaciones que ha usado la industria farmacéutica con éxito:

- a. Aproximación al Valor *Cut-off*: Todos los datos obtenidos para un determinado sitio son ubicados en un histograma. Los niveles de alerta y acción son establecidos como aquellos resultados de monitoreos que resultan respectivamente del 1% y 5% mayor que el nivel establecido para ese sitio. Se trabaja con 100 resultados de monitoreo y el percentil 95 y 99 establecen el nivel de alerta y acción.
- b. Aproximación a la Distribución Normal: Esta aproximación es mejor para recuentos altos (para bajos recuentos se usa Distribución Poisson). El promedio y la desviación estándar de los datos son calculados. Los niveles de alerta y acción son el promedio más 2 y 3 veces las desviaciones, respectivamente.
- c. Aproximación a los Límites de Tolerancias No Paramétricos: Los niveles de alerta y acción son establecidos usando métodos no paramétricos (distribución libre). Esto es útil para datos de monitoreo ambiental que tienen una distribución no normal, por ejemplo, presentan altos niveles de asimetría hacia recuentos cero.
- d. Otros modelos se basan en la binomial negativa, Poisson, Weibull o distribuciones exponenciales. Típicamente, la contaminación en ambientes estrictamente controlados, no cae dentro de una distribución normal.

Gerenciamiento de los datos ^[11 y 55]

Varias actividades son parte de este gerenciamiento, tales como la recolección de los datos, su análisis, aproximación usada para el análisis, e interpretación basada en n de los mismos. La revisión de rutina de los datos es fundamental para ayudar a la estabilidad de los procesos y su funcionamiento bajo control.

Es recomendable utilizar un número importante de muestras y un sistema computarizado de manejo de datos. Antes de la implementación, todas las aplicaciones de la base de datos deben ser validadas y calificadas para el sistema computarizado específico que haya sido elegido.

Análisis de los datos ^[55]

Las tendencias de los monitoreos ambientales son a menudo dificultosas de obtener y reconocer, debido al bajo número de colonias obtenido en los resultados. Los histogramas son una herramienta útil para ver cuál es la frecuencia más común donde caen los resultados. Diferentes clasificaciones de cuartos con diferentes requerimientos producirán diferentes histogramas. Un modelo matemático debe ser aplicado no solo con este objetivo en mente sino también para el tipo de datos a ser analizados.

En áreas grado A (ISO 5) donde los límites de acción típicos puede ser 1 microorganismo, no es fácil establecer tendencias. En estos casos, más que una tendencia pura de datos puede calcularse el rango tope conocido como "rango hit", por ejemplo, que tan común es encontrar un recuento dividido el número de muestras tomadas. En este ejemplo, si el *hit rate* se incrementa, deberíamos pensar que se produce una tendencia adversa. Si el *hit rate* decrece, el ambiente estará más limpio.

Aproximación al gerenciamiento de los datos ^[11 y 55]

Cuando los datos están siendo analizados, es importante conocer cómo la evaluación será conducida. Por ejemplo, un método generalizado que puede ser usado para evaluar los datos es:

- a. Determinar el objetivo del análisis: por ejemplo, análisis de los datos de un sitio, examen de la desviación de los datos microbiológicos, evaluación de que tan apropiados son los niveles de acción establecidos, actualizaciones, etc.
- b. Especificidad de los datos a ser analizados: por ejemplo: una semana, un mes, sólo los datos de un sitio específico.
- c. Aplicación de histogramas u otras herramientas para conocer la naturaleza de la distribución. También puede servir para conocer patrones o valores extremos no comunes. (*outliers*)
- d. Observar la distribución y procesar con el apropiado modelo matemático. Si los datos caen dentro de una distribución normal, un modelo matemático paramétrico puede ser usado. Si los datos no son consistentes con una distribución normal, una aproximación no paramétrica debe utilizarse.
- e. En el ejemplo que sigue, un nivel de acción al percentil 99% es utilizado. Consistente con el nivel de acción 99% son los siguientes modelos matemáticos (PDA, 2001). Los modelos pueden ser sólo aplicados si las características de los datos asumen una distribución definitiva.

Nivel de acción estimado de un conjunto de datos que reflejan una distribución exponencial o no normal: $4,6 \times$ promedio en cfu.

Nivel de acción estimado de un conjunto de datos que reflejan una distribución normal: $.2,33$ de la desviación standard + promedio en cfu.

Interpretación de los datos ^[11]

Todos los datos generados deben ser resumidos y evaluados para determinar si el ambiente de producción está bajo control. El control estadístico de procesos es uno de los métodos para realizar esta evaluación.

Caracterización de los microorganismos aislados

Para áreas Clase ISO 5, Grado A/B y el personal asociado, todos los microorganismos aislados deben ser identificados hasta nivel de especie.

Para áreas Clase ISO 7, Grado C, e ISO 8, Grado D: Cuando los niveles de acción son excedidos o hay tendencias con los niveles de alerta, las aislaciones deben ser identificadas al nivel de especie.

Un nivel de acción es equivalente a una tendencia en los niveles de alerta.

Si la identificación hasta especie falla, identificar hasta género.

El área de calidad debe tener documentado el perfil de los microorganismos típicamente aislados en cada área

y un procedimiento para proceder cuando se encuentran microorganismos atípicos.

Aisladores para realizar el testeo de esterilidad o procesos asépticos

El interior de un aislador debe ser ISO 5, Grado A.

El muestreo de aire y superficie seguirá las frecuencias de monitoreo correspondientes a operaciones asépticas.

El monitoreo ambiental para la manufactura de productos esterilizados terminalmente debe ser realizado como si fuera una operación aséptica.

Tendencias

El área de Calidad es responsable de proveer rutinariamente las tendencias de resultados correspondientes a largos y cortos períodos de tiempo.

El área de Calidad debe realizar un reporte con resultados de investigaciones, seguimientos relacionados con acciones provenientes de niveles de alerta y acción. Es conveniente tener un programa con estos datos y gráficos de los resultados.

El reporte debe ser realizado con una base mensual en el caso de áreas y personal de áreas críticas y en base trimestral para otras áreas. Un análisis de datos en base anual también es recomendable debido a diferencias de la flora microbiana durante los cambios estacionales. El reporte debe estar basado en parámetros tales como lugar, turno, lote, cuarto y operador. Debe indicar si ha habido cambios en la flora microbiana. En caso de tendencias adversas, el reporte debe indicar el plan de acciones correctivas.

Entrenamiento del personal

El entrenamiento del personal que trabaja en áreas controladas es crítico. El entrenamiento también es igualmente importante para el personal responsable por el programa de monitoreo ambiental.

En operaciones altamente automatizadas, el personal monitoreado puede ser el que está más directamente en contacto con las zonas críticas.

El muestreo microbiológico tiene un alto potencial de contribución a una contaminación debido a una inapropiada técnica de muestreo. Un programa de entrenamiento en este tema es requerido para minimizar el riesgo. Debe documentarse un entrenamiento formal del personal. El personal que opera en ambientes controlados debe tener conocimientos en principios microbiológicos relevantes. Entre los temas se incluyen: principios básicos en procesos asépticos, relación de la manufactura y los procedimientos de manipuleo de fuentes potenciales de contaminación de los productos. Principios básicos de microbiología, desinfección y sanitización, preparación y selección de medios, esterilización. El personal del laboratorio dedicado a las identificaciones microbiológicas debe tener entrenamientos de formación en estas prácticas y de actualización.

Deben incluirse entrenamiento en buenas prácticas de manufactura (GMP), conducción de investigaciones y análisis estadístico de datos.

Dado que el personal es la principal causa de contaminación es fundamental contar con personal entrenado.

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en el aire.

Métodos tradicionales.

Es sabido que los microorganismos presentes en el aire en un ambiente pueden afectar a la calidad microbiológica de los productos manufacturados o llenados en esas áreas. También es cierto, que la medición de los microorganismos presentes en esas áreas puede ser afectada por los instrumentos y procedimientos involucrados. Por lo tanto, cuando se utilizan métodos o equipos alternativos es necesario establecer una equivalencia de resultados.

Actualmente los muestreadores más comúnmente usados son los de impacto y centrífugos. A continuación se

describen los métodos y equipos tradicionalmente usados:

Muestreador de impacto: Este instrumento es más comúnmente conocido por su nombre en inglés, STA, *slit-to-agar* (de la rendija al plato de agar). Método sumamente eficaz, una tecnología comprobada y de confianza. Es el muestreador que suele usarse como referencia en las farmacopeas cuando se sugieren límites de colonias para las distintas áreas controladas. El muestreador imprime a un plato de agar una rotación de 360°, mientras lo mantiene a una distancia fija respecto de una rendija cortada con láser, una característica crucial para garantizar una máxima recuperación validada de los organismos que chocan con la superficie del agar. El aire entrante impacta en la placa de agar nutritivo. La placa con agar se incuba para permitir el crecimiento de los microorganismos. A menudo se utiliza una entrada remota del aire para minimizar disturbios del flujo laminar del aire del área controlada.

Muestreador por impacto Sieve. Consiste en un dispositivo diseñado para alojar a la placa de Petri conteniendo agar nutritivo. La tapa de la unidad es perforada con orificios de tamaño pre-establecido. Una bomba de vacío permite el paso de un volumen conocido de aire a través de la tapa. Las partículas del aire conteniendo microorganismos impactan en el agar. Algunos muestreadores disponen de una serie de tapas en forma de cascada con perforaciones decrecientes en tamaño. Estas unidades permiten separar por tamaño a las partículas conteniendo microorganismos en función del tamaño de poro.

Muestreador Centrífugo. La unidad consiste en una hélice o turbina que ingresa un volumen conocido de aire hacia la unidad y lo hace impactar tangencialmente sobre una tira plástica flexible conteniendo agar nutritivo.

Muestreador Esterilizable Atrium (Sterilizable Microbiological Atrium -SMA). Es una variante del muestreador por impacto Sieve ("*sieve impactor*") en que el aire es aspirado a través una tapa perforada sobre una placa de Petri. La tapa contiene orificios uniformemente espaciados. En la base de la unidad se coloca la placa de Petri conteniendo agar nutritivo. Una bomba de vacío controla el movimiento de aire a través de la unidad.

Muestreador de sistema de aire a superficie de agar. La unidad tiene una sección de entrada en donde se acomoda una placa de contacto conteniendo agar. Inmediatamente detrás de la placa hay un motor y turbina que moviliza el aire a través de una tapa perforada que cubre el agar.

Muestreador de filtro de gelatina. La unidad consta de una bomba de vacío con una manguera extensible que finaliza en un recipiente donde se coloca un filtro y que puede ser localizado en forma remota en zonas críticas. El filtro es de fibra de gelatina, capaz de retener los microorganismos. Después de un tiempo específico de exposición, el filtro es asépticamente removido y disuelto en un apropiado diluyente. El diluyente es vertido sobre agar nutritivo y puesto a incubar. Alternativamente, el filtro de gelatina puede ser transferido en forma directa sobre una placa de TSA solidificado y se incuba de acuerdo al protocolo.

Placas de sedimentación. Este método es el más comúnmente usado por ser simple y económico. Es útil para evaluaciones cualitativas y para tiempos de exposición prolongados. No es conveniente para evaluaciones cuantitativas de ambientes críticos. Las placas suelen ser de poliestireno cristal, esterilizadas por radiación gamma. También las hay de vidrio, re-utilizables, re-esterilizables, aunque éste no es el material recomendado para trabajar en áreas productivas. Generalmente son de 90 mm de diámetro y 14 mm de altura, aunque las hay de 55 mm de diámetro. Pueden ser utilizadas con medio de cultivo agarizado o alojar un *pad* absorbente de celulosa pura, estéril, que actúa de soporte de un medio de cultivo líquido. Pueden comprarse listas para usar o agregarles el medio de cultivo bajo condiciones asépticas en el lugar de uso. El medio de cultivo elegido dependerá de los microorganismos que se busquen controlar.

Una de las limitaciones de los muestreadores mecánicos de aire es la limitación en el tamaño de muestra tomada. Esto es más relevante cuando los resultados esperados del área son de muy bajo recuento de colonias. El muestreador *slit-to-agar* tiene una capacidad de muestreo de 80 litros/ minuto, lo que implicaría que si se busca muestrear un metro cúbico de aire, será necesario muestrear durante 15 minutos. Habrá veces que será necesario muestrear más volumen de aire por lo que se requerirán tiempos superiores a 15 minutos. Si bien estos muestreadores tienen capacidad para muestrear rangos altos de volumen habrá que considerar las posibilidades de interrupción del flujo laminar en áreas críticas o la generación de turbulencias que podrían aumentar el riesgo de contaminación.

En el caso de los muestreadores centrífugos, un número importante de estudios muestran que tienen preferencia por las partículas grandes. Este tipo de muestreadores podrán generar resultados más altos debido a esta selectividad inherente. Cuando se seleccione un muestreador centrífugo, habrá que considerar si se afecta la linealidad del flujo de aire. Se podrá entonces usar tubos extras que permitan aumentar la distancia a la zona crítica. Pero nuevamente, habrá que evaluar si estas extensiones no afectan la linealidad del aire. De no haberse salvado la dificultad, habrá que introducir un factor de corrección para los resultados.

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en superficie.

Métodos tradicionales

Otro punto a tener en cuenta en el programa de monitoreo microbiológico ambiental es el control de las superficies de equipos, facilidades y personal. Los métodos de control de superficies no han sido tan estandarizados como lo fueron los de aire. Con el objeto de afectar lo menos posible el desarrollo de operaciones críticas, los controles de superficie de rutina se suelen realizar finalizada la tarea la operación. Sin embargo, en situaciones especiales tales como validaciones e investigaciones se amplían estos muestreos y se incluyen controles antes y durante la operación.

El control de superficie, generalmente se realiza en lugares que pueden tener contacto con el producto o áreas adyacentes a estas primeras.

Los dos métodos más utilizados son el método de placa de contacto y el de hisopado.

Placas de Contacto. El uso de placas de contacto conteniendo nutrientes es elegido cuando las superficies a controlar son superficies regulares. Se realiza una presión controlada del agar de la placa sobre la superficie y esa misma placa se incuba por un tiempo y temperatura controlada. Las placas pueden usarse con distintos medios de cultivo, dependiendo la elección del tipo de control que se busque realizar. Las placas pueden comprarse listas para usar o agregarles el medio bajo condiciones asépticas en el lugar de uso. El medio de cultivo puede ser preparado en el lugar de uso o es posible comprar kits comerciales que traen viales de distintos medios estériles dosificado para llenar una placa o varias según le convenga al usuario.

Hisopado. El método de hisopado es elegido cuando se tienen superficies a muestrear irregulares. El hisopo una vez pasado por la superficie, es colocado en un apropiado diluyente y la estimación de microorganismos es realizada por plaqueo de una alícuota en agar nutritivo. La superficie a muestrear es previamente establecida. Generalmente se muestrean superficies de entre 25 a 30 cm². Los hisopos pueden ser de distintos materiales, tales como algodón, dacrón, alginato de calcio, etc. Los mangos son generalmente plásticos ya que en la industria farmacéutica se busca evitar el uso de mangos de madera. Existen también kits comerciales que proveen un hisopo que se pasa por la superficie a controlar y luego es introducido en un blíster dejando que entre en contacto con el gel reactivo. Una vez realizada esta operación, se introduce dentro de una incubadora durante aproximadamente 16 horas y se comprueba la presencia o ausencia de microorganismos observando el cambio de color de la sustancia.

Existen distintos tipos de kits de control microbiológico: Generales, que detectan ausencia o presencia de microorganismos y Específicos para la detección de determinados microorganismos tales como estafilococos, coliformes, salmonella, etc.

Ambos métodos, hisopado y placas de contacto tienen baja capacidad de recuperación, según se observa en

estudios de validación.

Lavado y Plaqueo. Este método permite la toma de muestras de gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente. Las muestras de enjuague pueden entregar evidencia suficiente de una limpieza adecuada cuando la accesibilidad a las piezas de los equipos impide el muestreo directo de la superficie. Puede ser útil para verificar la eliminación de residuos de los agentes de limpieza o la presencia de contaminación microbiana.

El método consiste en hacer pasar un diluyente, como por ejemplo, agua peptonada al 0.1% por la superficie a controlar. Tomar una alícuota de ese diluyente y sembrarlo en placas de Petri, incubando un juego de placas a temperatura de proliferación de bacterias y otro juego a temperatura de crecimiento de hongos. También puede ocurrir que en lugar de plaquear una alícuota de enjuague se haga pasar un volumen importante de diluyente por una membrana filtrante y sea esta membrana la que se incuba en los medios y a las temperaturas adecuadas.

Film Flexible. Son placas de un material flexible, que favorece el monitoreo de las superficies. Los films pueden contener medios generales o especiales con agregados de agentes selectivos, nutrientes, agentes gelificantes, indicadores cromogénicos que facilita la detección de las colonias para la identificación/ cuantificación de las mismas. Luego de la incubación, las placas pueden leerse directamente o a través de un lector en forma automática.

Métodos No Tradicionales y Rápidos para el Monitoreo Ambiental Microbiológico

Como se discutiera anteriormente, el monitoreo ambiental microbiológico de las instalaciones dedicadas a la manufactura farmacéutica provee la información necesaria que asegura un control de la producción de acuerdo a las normas regulatorias vigentes. Como se discutiera en las secciones precedentes, existe una amplia variedad de métodos tradicionales de ensayo que se emplean para el monitoreo y están resumidos en la Tabla 4. Los métodos utilizados tienen que estar claramente documentados, incluyendo los niveles de alerta y acción apropiados. Los límites para monitoreo ambiental microbiológico y de partículas no-viables se pueden encontrar en documentos publicados por la Organización Mundial de la Salud [4].

Tabla 4. *Métodos de control de aire y superficies.*

Tipo de Ensayo	Método Tradicional
Aire (Activo)	Placa de Impacto
Aire (Pasivo)	Placa de Sedimentación
Superficies	Placa de Contacto
Superficies	Lavado y Plaqueo
Superficies	Hisopos
Personal – Superficie	Guantes Descartables / Ropa. Placas Rodac

El monitoreo provee datos referentes al número de partículas totales y el número de partículas microbianas viables en el aire, como así también el número de colonias microbianas presentes sobre superficies variadas, incluyendo también el análisis de la carga biológica aportada por los operarios que trabajan en las zonas bajo control.

El número de partículas en el aire se puede determinar en forma rápida gracias al uso de **contadores de partículas**. Estos instrumentos colectan una cantidad predeterminada de aire y proveen los resultados del número de partículas de acuerdo al tamaño. Los resultados se obtienen en unos pocos minutos de monitoreo permitiendo una respuesta rápida en el caso que en un área particular de manufactura esté presente una alta carga de partículas en el aire. Lo último es muy importante ya que permite cerrar esa área, llevar a cabo la investigación y corregirla lo más rápidamente posible de manera de poder continuar con la producción sin demora. Una respuesta rápida también posibilita que los productos farmacéuticos manufacturados durante el episodio de emergencia puedan ser separados del resto de la producción sin perjudicar el resto.

Desafortunadamente, los resultados correspondientes a los ensayos microbiológicos no nos dicen en forma suficientemente rápida si hay una contaminación con microorganismos viables. Los métodos utilizados en forma tradicional para el monitoreo de microorganismos requieren que estos sean tomados usando un colector de aire, o con el uso de placas de sedimentación, y para superficies con el uso de hisopos, placas de contacto, o por lavado de superficies y plaqueo. En cualquiera de esos casos las placas de muestras deben ser incubadas por un período de tiempo que oscila típicamente entre 3 y 7 días, y recién en ese momento las colonias son contadas y el resultado es comunicado. Este retraso en la comunicación de los resultados ocasiona a su vez un retraso en la toma de acción para solucionar una contaminación haciendo todo tipo de investigación muy difícil. Para el momento en que los resultados son conocidos, el área de manufactura ya ha sido probablemente limpiada y la toma de nuevas muestras no pueden, en la mayoría de los casos, proveer información sobre la causa que originó la contaminación. Debido al hecho que la respuesta a esta contaminación no es suficientemente rápida, la producción corre el riesgo de tener que ser descartada.

Como dijimos, la gran mayoría de estos métodos se basan en el crecimiento del cultivo microbiano en un medio líquido o sólido y bajo condiciones de incubación bien definidas (temperatura, humedad, medio aeróbico o anaeróbico, etc.). Después de uno o más días de incubación, la presencia de contaminación microbiana es detectada por el incremento de turbidez en el medio líquido, o por la presencia de colonias creciendo sobre el medio sólido (agar) una vez que se hacen visibles a la vista humana. Es importante mencionar que los ensayos tradicionales, a pesar de ser lentos debido al tiempo de incubación requerido, presentan varias ventajas. En general son métodos simples, relativamente de bajo costo, y lo suficientemente sensibles como para detectar la presencia de uno o un pequeño número de microorganismos por la observación de colonias sobre el medio sólido después de un período de incubación adecuado. Es también muy importante destacar que los métodos tradicionales son ampliamente aceptados por las autoridades y por las organizaciones de control de calidad farmacéutica.

La Tabla 5 muestra los capítulos más importantes relacionados al control de calidad microbiológico que se encuentran en la farmacopea de los Estados Unidos ^[1]. Los conceptos generales incluidos en esa farmacopea son también considerados en capítulos correspondientes de la Farmacopea Argentina.

¿Cómo se definen los Métodos Microbiológicos Alternativos y Rápidos?

Durante los últimos 10 años estamos presenciando un crecimiento muy rápido en el número de métodos microbiológicos rápidos aplicables al control de calidad que se están ofreciendo comercialmente a través de una gama variada de vendedores especializados. Este es el resultado de la convergencia de un gran número de avances tecnológicos en áreas tan diversas como biología molecular, nanotecnología, electrónica, imágenes por computación, microinstrumentación, y microfluidos ^[13]. Los nuevos sistemas para la detección, enumeración, e identificación de microorganismos se han desarrollado en un período de tiempo relativamente corto y están, como se mencionara anteriormente, ya siendo comercializados. Estas plataformas técnicas junto con los reactivos y elementos descartables asociados, son conocidas como Métodos Microbiológicos Alternativos y Rápidos, y pueden ser aplicadas para evaluar el control microbiológico en áreas de industrias tan diversas como la farmacéutica, la alimenticia, cosmética, diagnóstico clínico, y bio-defensa ^[14-15].

En general, las nuevas tecnologías requieren un número menor de células microbianas para la detección, y los resultados se obtienen en un tiempo mucho menor que las técnicas tradicionales. Muy importante de destacar es que algunas de estas tecnologías ofrecen información más precisa y detallada que las técnicas tradicionales, y tienen un diseño más apropiado para la automatización.

Tabla 5. Lista de los capítulos incluidos en las Farmacopeas de los Estados Unidos y Argentina que consideran Monitoreos ambientales

Cap.	Título	Aplicabilidad
<51>	<i>Antimicrobial Effectiveness Testing</i>	Formulación de productos medicinales
<55>	<i>Biological Indicators – Resistance Performance Tests</i>	Productos estériles. Esterilización terminal
<61>	<i>Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests</i>	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<62>	<i>Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms</i>	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<71>	<i>Sterility Tests</i>	Productos estériles: Ensayos de Esterilidad
<81>	<i>Antibiotics – Microbial Assays</i>	Antibióticos
<85>	<i>Bacterial Endotoxins Test</i>	Productos estériles: Límites de Endotoxinas bacterianas.
<1035>	<i>Biological Indicators for Sterilization</i>	Productos estériles: Esterilización terminal
<1072>	<i>Disinfectants and Antiseptics</i>	General
<1111>	<i>Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products</i>	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<1112>	<i>Application of Water Activity Determination to Nonsterile Pharmaceutical Products</i>	Productos no estériles y general
<1116>	<i>Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments</i>	General, y productos no estériles: Procesos asépticos
<1117>	<i>Microbiological Best Laboratory Practices</i>	General
<1207>	<i>Sterile Product Packaging – Integrity Evaluation</i>	Productos estériles
<1208>	<i>Sterility Testing – Validation of Isolator Systems</i>	Productos estériles: Ensayos de esterilidad, Procesos asépticos.
<1209>	<i>Sterilization – Chemical and Physicochemical Indicators and Integrators</i>	Productos estériles: Esterilización Terminal
<1211>	<i>Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles</i>	Productos estériles: Procesos asépticos, Filtración, Esterilización Terminal
<1222>	<i>Terminally Sterilized Pharmaceutical Products – Parametric Release</i>	Productos estériles: Esterilización Terminal
<1223>	<i>Validation of Alternative Microbiological Methods</i>	General, Validación de métodos microbiológicos rápidos alternativos
<1225>	<i>Validation of Compendial Methods</i>	General
<1227>	<i>Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles</i>	General
<1231>	<i>Water for Pharmaceutical Purposes</i>	General
<2021>	<i>Microbial Enumeration Tests – Nutritional and Dietary Supplements</i>	Productos no estériles: Límites microbiológicos
<2022>	<i>Microbiological Procedures for Absence of Specified Microorganisms – Nutritional and Dietary Supplements</i>	Productos no estériles: Ausencia de microorganismos objetables
<2023>	<i>Microbiological Attributes of Nonsterile Nutritional and Dietary Supplements</i>	Límites microbiológicos
Cap. 1020	Buenas prácticas de fabricación y control. Farmacopea Argentina [5].	En el ítem 15- Buenas prácticas de fabricación: indica controles microbiológicos periódicos de las áreas donde se procesan productos susceptibles de contaminación y requiere sus correspondientes registros. En el ítem 17- Productos farmacéuticos estériles: indica la necesidad de controles ambientales de aire y superficie de las áreas limpias a intervalos de tiempo preestablecidos para asegurar un ambiente dentro de especificación.

Si bien estos métodos pueden ser aplicados al control de calidad microbiológico en prácticamente todos los tipos de muestras de la industria farmacéutica, la discusión que sigue se focalizará en el empleo potencial de aquellos métodos que presentan características más apropiadas para su uso en el monitoreo microbiológico.

Microbiología Rápida en el Monitoreo Ambiental

Es importante hacer notar que las técnicas rápidas pueden ser agrupadas en tres áreas según el tipo de resultado obtenido. Los resultados pueden ser (1) cualitativos, es decir que describen si hay o no contaminación en la muestra analizada; (2) cuantitativos cuando se demuestra el número de microorganismos medidos en el ensayo; y (3) identificativos, cuando el método no sólo detecta sino también identifica el contaminante microbiano presente en la muestra.

Las técnicas microbiológicas rápidas también se pueden clasificar de acuerdo a la tecnología básica que emplean para detectar los microorganismos ^[16]. Estas son: (1) Detección en base a crecimiento o actividad metabólica; (2) Medición de viabilidad; y (3) Detección de un componente celular específico. La discusión de cada uno de los ejemplos de técnicas rápidas aplicadas al monitoreo microbiológico que se desarrolla a continuación se basa en este tipo de clasificación.

(1) Tecnologías Basadas en el Metabolismo Activo y/o Crecimiento

Estas tecnologías miden el crecimiento celular directamente o a través de parámetros bioquímicos o fisiológicos que son indicadores de metabolismo microbiano. En algunos casos las muestras a ensayar son transferidas a medios de cultivo tradicionales o variaciones de los mismos que han sido enriquecidas con una formulación adecuada para favorecer la proliferación de microorganismos. La ventaja más importante de este tipo de sistemas es que permiten la recuperación de los microorganismos para estudios de caracterización e identificación u otros ensayos necesarios en caso de una investigación.

Sistema de Microbiología Rápida Pallchek:

El uso del ensayo de bioluminiscencia basado en el uso de adenosina tri-fosfato (*adenosine triphosphate* o ATP) en la evaluación microbiológica de productos y ambientes farmacéuticos está muy bien documentado y establecido ^[17]. Pallchek fue una de las primeras tecnologías de microbiología rápida aceptada por los más importantes entes regulatorios, y por esto existen numerosos y diversificados ejemplos de aplicaciones de análisis microbiológico en la industria farmacéutica, cosmética, y alimenticia ^[18-21].

La reacción de bioluminiscencia que usa luciferina y ATP está catalizada por la enzima luciferasa extraída de la luciérnaga (luciferina 4-monooxygenasa, EC 1.13.12.7), que cataliza la oxidación de D-luciferina en presencia de ATP, iones de magnesio, y oxígeno molecular (Figura 1). La molécula de ATP, que constituye la fuente principal de energía almacenada en las células de todos los seres vivos, es el factor más importante de esta reacción^[22]. La reacción produce un *quantum* de luz amarilla de 564nm por cada molécula de luciferina oxidada ^[23-24]. La luz producida por la reacción de luciferina-luciferasa es proporcional a la cantidad de ATP usado y en el caso del Pallchek, es medida en Unidades Relativas de Luz (URL) por un luminómetro portátil. En los ensayos microbiológicos, donde la fuente de ATP usada en la reacción proviene de los microorganismos contaminantes de una muestra farmacéutica. La cantidad de luminiscencia medida en URL puede ser correlacionada al número de células microbianas presentes en la muestra. Esta correlación es lineal sobre un margen muy amplio de carga microbiana ^[25].

Figura 1 La Reacción de Bioluminiscencia Catalizada por la Luciferasa



El sistema Pallchek consiste de un pequeño luminómetro portátil, kits de reactivos, y elementos descartables. Las aplicaciones más comunes de este sistema se basan en la filtración de muestras líquidas a través de una membrana y la medida de la contaminación microbiana retenida sobre esa membrana por bioluminiscencia. Para el monitoreo ambiental se lo puede aplicar para ensayos de agua, superficies (líquidos recuperados de hisopos y lavados), y contaminantes provenientes de muestras de aire recuperadas en medio líquido por el Coriolis (ver más adelante) [26-27].

Como se mencionara previamente, las aplicaciones más comunes comienzan con una filtración de la muestra líquida. Después de este paso, la membrana de filtración es lavada con una solución fisiológica estéril para eliminar cualquier componente presente en la muestra que pueda interferir con la reacción de bioluminiscencia, y también cualquier residuo de ATP libre que pueda estar presente en la muestra a analizar. Esto último asegura que en caso de una contaminación, sólo ATP localizado intracelularmente en las células microbianas es detectado. A continuación se agrega un reactivo sobre la membrana que cumple con la función de liberar el ATP localizado en el interior de los microorganismos, y luego se agrega una mezcla de luciferina y luciferasa. La reacción se mide en el luminómetro por la bioluminiscencia producida en un tiempo de 10 segundos. Si la muestra se presume que posee una carga bacteriana muy baja, la membrana puede ser incubada en un medio líquido de crecimiento por un período de 6, 12 o más horas. Esta etapa tiene la función de aumentar el número de células contaminantes para permitir la detección en los casos en que sólo una o más células están presentes en la muestra original. El último paso ha sido particularmente útil para el uso de esta metodología en un ensayo rápido de esterilidad, reduciendo el tiempo de incubación de 14 a 4 días [28].

Como se mencionara previamente, el tiempo de detección de una contaminación usando Pallchek es menos de una hora si la muestra es analizada en forma inmediata, o un día o más si la muestra es incubada en medio líquido para aumentar el número de células del microorganismo contaminante a un nivel por sobre el límite de detección del instrumento. En relación a otros instrumentos de microbiología rápida, Pallchek es un sistema de bajo costo, lo cual facilita su implementación.

Uso en monitoreo ambiental: Este método puede ser empleado para el análisis de superficies con muestras provenientes de hisopados o de lavados de superficies. También puede ser empleado para el monitoreo de agua potable y de calidad farmacéutica. Monitoreo de aire es también posible si las muestras son recuperadas en un medio líquido por burbujeo (ver la sección dedicada a Coriolis más adelante).

BacTAlert

Este sistema fue uno de los primeros métodos rápidos en salir al mercado. El modelo BacTAlert 3D Dual-T es completamente automatizado y tiene la capacidad de detectar contaminaciones microbianas a dos temperaturas diferentes, 32.5°C y 22.5°C [29]. Una aplicación pionera de este sistema fue su uso en un método rápido de esterilidad en para productos de terapia celular que poseen una vida media muy corta [30]. En este sistema, el CO₂ producido durante el crecimiento de microbios contaminantes es detectado a través de unos detectores muy sensibles a los cambios de pH que se encuentran incorporados en la botella que contiene el medio de cultivo. Estos sensores cambian de color en proporción a la cantidad de CO₂ producido por el crecimiento de los microbios contaminantes. El cambio de color del sensor es a su vez detectado por un elemento que traducirá estas señales en unidades de reflexión. La sensibilidad del sistema es aproximadamente 1 CFU/ml. En una evaluación de este sistema por uno de los autores se encontró que ciertos cultivos bacterianos ambientales de crecimiento lento no eran detectados por este instrumento. Aparentemente el “software” necesitaba una calibración más sensible para aceptar cambios de color que ocurren muy lentamente en un período de tiempo relativamente largo. Este problema parece haber sido solucionado en versiones más recientes del instrumento. En general, el tiempo de detección de una contaminación usando BacTAlert es aproximadamente un 50% más corto que el tiempo tradicional. Debido a que el costo de este sistema es relativamente alto, es necesario hacer un análisis económico muy cuidadoso de retorno de inversión para justificar su compra y uso en aplicaciones de monitoreo.

Uso en monitoreo ambiental: Este método puede ser empleado para el test de superficies con muestras provenientes de hisopados o de lavados de superficies. También puede ser empleado para el monitoreo de agua potable y de calidad farmacéutica.

Este sistema permite una enumeración de colonias microbianas mucho más rápidamente que el método convencional basado en la observación directa de las placas de agar por el analista ^[31-32]. El sistema usa tecnología de imágenes digitales y microscopia para observar la aparición de microcolonias sobre la placa de agar, en un tiempo mucho más corto que la observación visual. Generalmente, esta metodología posibilita la obtención de un resultado en la mitad del tiempo empleado por la técnica convencional. El método no destruye los microorganismos por lo cual, en caso de un resultado positivo, permite la caracterización e identificación del contaminante en pasos posteriores. El sistema es completamente automático y de grandes dimensiones. Debido a su similitud con el método tradicional (está basado en la detección de colonias creciendo sobre medio sólido y usa similares medios de cultivo y condiciones de incubación) su aceptabilidad por los entes regulatorios está significativamente facilitada. El costo del instrumento, como así de los elementos descartables, es muy importante. Se puede sin embargo encontrar una justificación en el caso de un laboratorio con un nivel de ensayos diarios muy grande, o aplicaciones farmacéuticas muy especiales ^[33].

Uso en Monitoreo Ambiental: Este sistema es aplicable a todos los casos de análisis microbiológicos donde el método tradicional está basado en la enumeración microbiana por conteo sobre placas de agar.

(2) Tecnologías Basadas en Medición de Viabilidad

Los métodos basados en viabilidad celular, también conocidos como métodos de medición directa, no requieren crecimiento celular para la detección de microorganismos. Los métodos más conocidos dentro de esta categoría están basados en el uso de marcadores fluorescentes y *scanning* con rayos laser combinados para medidas citométricas en flujo líquido o sobre fase sólida.

Chemunex ScanRDI

El ScanRDI es una de las tecnologías de microbiología rápida más difundidas y aceptadas en un número de aplicaciones farmacéuticas ^[34]. Los ensayos citométricos sobre fase sólida están basados en la detección de células microbianas individuales y viables gracias al uso de colorantes indicativos de viabilidad. El método hace uso de sustratos no-fluorescentes específicos que cuentan con la capacidad de liberar un fluorocromo en el citoplasma de células metabólicamente activas. Sólo este tipo de células, incluyendo esporas, tienen la habilidad de romper el sustrato no-fluorescente y liberar el fluorocromo vía una esterasa intracelular. Aún células que han pasado por situaciones de stress muy agudo, como por ejemplo microorganismos sobreviviendo en medios carentes de sustancias nutritivas como agua para procesos farmacéuticos, conservan esta actividad de esterasa. Aún más, todos los microorganismos que pueden catalogarse dentro del grupo de los viables pero no cultivables van a ser detectados por la técnica de citometría por *laser scanning*. La retención de este sustrato en el interior de las células ocurre sólo en aquellas que conservan su membrana celular en forma íntegra, una prueba más de su viabilidad. El método es tan sensible que es capaz de detectar células individuales ^[35]. Entre algunas de las desventajas de esta plataforma se pueden mencionar el alto costo de la instrumentación, reactivos y elementos descartables, como así también una relativa intensidad de mano de obra que la hace menos apropiada para aplicaciones con un alto número de muestras (en general, el número máximo de muestras procesadas por operario por día es entre 20 y 30). La identificación de los microorganismos detectados por este método fue hasta hace muy poco tiempo atrás no posible debido a la inactivación celular producida durante la detección. Sin embargo, una modificación al protocolo del procesamiento de las muestras (información aun no publicada) haría posible la identificación de las bacterias detectadas por este sistema.

Uso en Monitoreo Ambiental: Este sistema es aplicable en todos los casos de análisis microbiológicos basados en una filtración inicial de una muestra líquida. Por lo tanto, monitoreo de agua, y muestras de lavado e hisopados de superficies o de aire con captura de microorganismos en medio líquido son aplicaciones posibles para este método.

(3) Tecnologías Basadas en la Detección de Componentes Celulares Específicos

Monitoreo Rápido de Muestra de Aire

Como mencionáramos anteriormente, el monitoreo ambiental es uno de los requerimientos básicos más importantes de la manufactura farmacéutica. Dentro de los requerimientos de control, la detección de partículas viables e inertes es de particular importancia. Los métodos microbiológicos para muestras de aire disponibles hasta no hace mucho tiempo atrás se basaban en la tecnología de cultivo tradicional. Esto implicaba que los resultados no eran inmediatos. Para el momento en que los resultados se hacían disponibles, las condiciones del sitio afectado ya habían sido tratadas y no quedaba ninguna traza de la contaminación original para poder hacer una investigación adecuada y arribar a conclusiones y medidas correctivas. En los últimos años la situación ha cambiado considerablemente gracias al desarrollo comercial de dos tecnologías muy similares que detectan partículas viables en forma continua e inmediata en tiempo real. Como se discutirá en la próxima sección, estos instrumentos no sólo son mucho más veloces que las técnicas convencionales, sino que brindan una nueva dimensión en el conocimiento y condición de control de un área de manufactura y las causas que pueden comprometer ese medio ambiente y desviarlo de los niveles aceptables.

Biovigilant y BioLaz

Como indicáramos previamente, estos sistemas se basan en tecnologías utilizadas para el monitoreo microbiológico de muestras de aire. Ambos instrumentos detectan la presencia de microorganismos en tiempo real y continuo. El flujo de aire ingresa en forma continua en el instrumento y es dirigido hacia una cámara de detección donde las partículas en el aire son interceptadas por un rayo láser de 405 nm. La manera en que la luz del rayo láser se dispersa es medida por un detector de dispersión (*"scattering"*) que provee un valor estimado del tamaño de las partículas en el aire. Al mismo tiempo el rayo láser produce una autofluorescencia natural en ciertos metabolitos que se encuentran sólo en el interior de células biológicamente activas. Estas moléculas son la riboflavina, NADH y NADPH, y ácido dipicolínico (presente en esporas). Los resultados son presentados en gráficos que representan el número de partículas biológicas detectadas a través del tiempo en intervalos de 10-20 segundos. Algo importante de destacar es que estos sistemas detectan en general muchas más partículas biológicamente activas que las unidades formadoras de colonias contadas sobre placas de agar. La diferencia es probablemente debida a la gran cantidad de células microbianas que forman parte del grupo de microorganismos viables pero no cultivables. Este grupo comprende una flora muy diversa de células estresadas por condiciones de calor o frío, medios faltos de nutrientes, o exceso de ellos, niveles inadecuados de oxígeno, tratamientos con desinfectantes, deshidratación, envejecimiento, como así también numerosas especies microbianas que no crecen en los medios convencionales y en las condiciones de cultivo recomendadas por las farmacopeas. Debido a esta disparidad en el número detectado por estas tecnologías y las tradicionales, aún no se han implementado estas técnicas rápidas en reemplazo completo de las tradicionales. Su uso, en forma cautelosa, se está expandiendo como una tecnología suplementaria que indica la aparición de un problema mucho antes que las técnicas tradicionales, y posibilita una toma de acciones correctivas en forma casi inmediata. Otra de las aplicaciones muy útiles de estos instrumentos es el diseño de nuevos procesos de manufactura, la caracterización de puntos de contaminación más frecuentes, investigaciones, determinación de riesgos, y en el entrenamiento de personal. Para esto, una de las tecnologías (Biovigilant) cuenta con una cámara que graba lo que está ocurriendo en el local de manufactura y permite correlacionar un pico de actividad de partículas biológicas con una intervención humana incorrecta o cualquier otro factor que puede estar perjudicando la calidad del aire ^[36-37]. Entre las desventajas de esta tecnología es la imposibilidad de recuperar e identificar los microorganismos que son detectados por este instrumento. La inversión de capital es también importante, aunque es bueno destacar que no hay costos asociados con reactivos ni descartables ya que la muestra de aire no requiere ninguna preparación ni manipulación subsiguiente.

Uso en Monitoreo Ambiental: Ideal como tecnología suplementaria a los tradicionales colectores de muestras de aire por impacto o por sedimentación.

Tecnología de Captura de Microorganismos en Medio Líquido: Coriolis

El sistema "*Coriolis® µ cyclonic air sampler*" (Bertin Technologies, France) para la captura de microbios flotando en el aire a través de un medio líquido que ha sido validado de acuerdo a la norma ISO 14698 es una variación

más sofisticada de un sistema tradicional de aparatos utilizados para la recuperación de muestras de aire [38]. Una de las características más importantes de este sistema es el uso de un medio líquido estéril en reemplazo de las placas de agar para la captura de los microbios contaminantes en el aire. La recuperación de las células microbianas en un medio líquido posibilita la detección, enumeración e identificación de estos contaminantes por el uso de técnicas rápidas y específicas a nivel molecular [27].

El sistema SAS-PCR (PBI biosciences International) también se basa en la cosecha de microbios aéreos en un líquido de cultivo estéril. Este sistema posibilita la detección e identificación de los microorganismos por el uso de técnicas rápidas a nivel molecular.

Detección de Ácidos Nucleicos

Las técnicas microbiológicas rápidas basadas en la detección de ácidos nucleicos por amplificación han recibido una atención cada más creciente desde el ataque terrorista del 11 de Septiembre del 2001 en New York. Desde ese entonces las nuevas demandas en bio-defensa crearon una oportunidad de mercado para el desarrollo de técnicas rápidas de detección, enumeración e identificación de microorganismos [13]. A partir de entonces, estas técnicas ofrecieron la oportunidad de ser empleadas en la industria farmacéutica.

Una de las técnicas con mayores ventajas debido a su reproducibilidad y sensibilidad es la amplificación de ADN bacteriano por la acción de una polimerasa muy resistente a incubaciones a elevada temperatura ("*Polymerase Chain Reaction*, PCR"). Otros métodos similares de amplificación están basados en el uso de RNA como templado, la tipificación de ARNs ribosomales, y el secuenciamiento de las cadenas de ADN [39]. Una tecnología basada en el método de PCR cuantitativo ("qPCR") [40] que presenta una suma de características adecuadas para su uso en el monitoreo microbiológico ambiental se discute a continuación.

GeneDisc (Pall):

Este sistema está basado en detección de ADN microbiano usando la técnica de PCR (qPCR).

La técnica del PCR ha sido aplicada a innumerables proyectos de investigación y desarrollo en biología molecular desde su primera descripción en 1983 [41-42]. Este método de amplificación de ADN ha sido también usado extensivamente en el área de microbiología aplicada. Como ejemplo de las primeras aplicaciones de esta tecnología, el uso de PCR para clonar y mapear fragmentos específicos de genoma bacteriano [43] fue aplicado para la construcción por ingeniería genética de una cepa mutante de *Streptomyces avermitilis* capaz de producir antiparasitarios no naturales por el autor y colaboradores [44] y en otras especies [45-46]. En años recientes la cantidad de ensayos e instrumentos basados en el uso de PCR se ha ido incrementando aceleradamente y son actualmente usados en un número variado de industrias tales como bio-defensa, cosméticos, forense, bebidas y alimentos, diagnóstico clínico, y productos farmacéuticos [47-49].

A partir de la descripción original de la técnica de PCR como método para amplificar ADN, numerosas variaciones de este método pueden encontrarse en la literatura. Una de ellas es conocida como PCR cuantitativo (qPCR) [40]. Esta técnica puede ser utilizada para la enumeración de microbios contaminantes en el área microbiológica del control de calidad de medicamentos. El PCR cuantitativo sigue una curva exponencial de crecimiento de los productos genómicos amplificados y puede ser monitoreada en forma continua durante 30-50 ciclos de amplificación, permitiendo calcular la cantidad inicial de ADN específico en la muestra. Debido a que la cantidad de ADN detectado por el PCR cuantitativo es directamente proporcional al número de células microbianas presentes en una muestra particular, se puede construir una curva de correlación entre el número de moléculas de ADN y el número de células, permitiendo presentar un resultado estimado en número de microorganismos por unidad de masa o volumen de la muestra farmacéutica original. A menos que el tipo de microorganismo presente en la muestra es conocido, y una curva de correlación fue construida durante la validación del método, el resultado es un estimado debido a que la cantidad de ADN (o de copias genómicas) por célula difiere en los diferentes géneros y aún dentro de los microorganismos pertenecientes a una misma especie dependiendo del estado metabólico de las células al momento del análisis.

Una Metodología de Microbiología Rápida para el Monitoreo Ambiental Basada en el qPCR

Recientemente, ha aparecido en el mercado comercial una tecnología basada en el PCR cuantitativo (Pall's GeneDisc® Rapid Microbiology System) que presenta características muy apropiadas para aplicaciones en el área de la microbiología de control de calidad, ver Tabla 6.

Tabla 6. Características técnicas más importantes del Sistema GeneDisc

- Tecnología basada en una técnica conocida, robusta y altamente desarrollada como el PCR.
- El uso de curvas Estándar usando soluciones estándar de ADN microbiano altamente purificado durante operaciones rutinarias asegura un control inmediato del funcionamiento correcto del equipo y los reactivos.
- Linearidad de respuesta sobre un margen muy amplio de concentraciones de ADN.
- El diseño novedoso de los bloques termales y del sistema de detección óptica aseguran una operación altamente consistente y reproducible.
- El sistema electrónico es muy fácil de usar y brinda los resultados en forma cualitativa (Presencia o Ausencia) o cuantitativa (número de copias genómicas o de células) de acuerdo a la aplicación o ensayo.
- Transferencia de datos a otros sistemas electrónicos es muy simple y rápida.
- Cada ensayo tiene ya incorporado reactivos para controles negativos y positivos.
- Los discos permiten la detección, enumeración, e identificación de microorganismos en menos de 3 horas dependiendo de la aplicación.
- Todos los reactivos y elementos de consumo, como así también los parámetros de cada ensayo vienen codificados en código de barras.
- Los reactivos más importantes para el PCR están dispensados en el disco sellado y listo para el ensayo disminuyendo altamente la posibilidad de errores de manipulación.

Este sistema es relativamente simple y de fácil uso e implementación. Es muy interesante destacar que, a diferencia de otros sistemas similares, el uso de esta instrumentación no requiere experiencia previa en biología molecular. Lo último es una característica muy importante para la implementación en la industria farmacéutica donde tecnologías complicadas y entrenamiento de personal prolongado y específico se han sumado como impedimento en la propagación de estas técnicas en forma más generalizada [39]. Como este instrumento hace uso de reactivos ya premezclados y el sistema electrónico viene ya calibrado para la aplicación específica en microbiología de control de calidad, el uso en operaciones de rutina se ve altamente facilitado.

Una metodología muy simple basada en el PCR:

El primer paso del método GeneDisc consiste en la filtración de la muestra farmacéutica a través de una membrana filtrante, seguido por la extracción del ADN usando un sonicador y un baño de agua caliente para liberar los ácidos nucleicos.

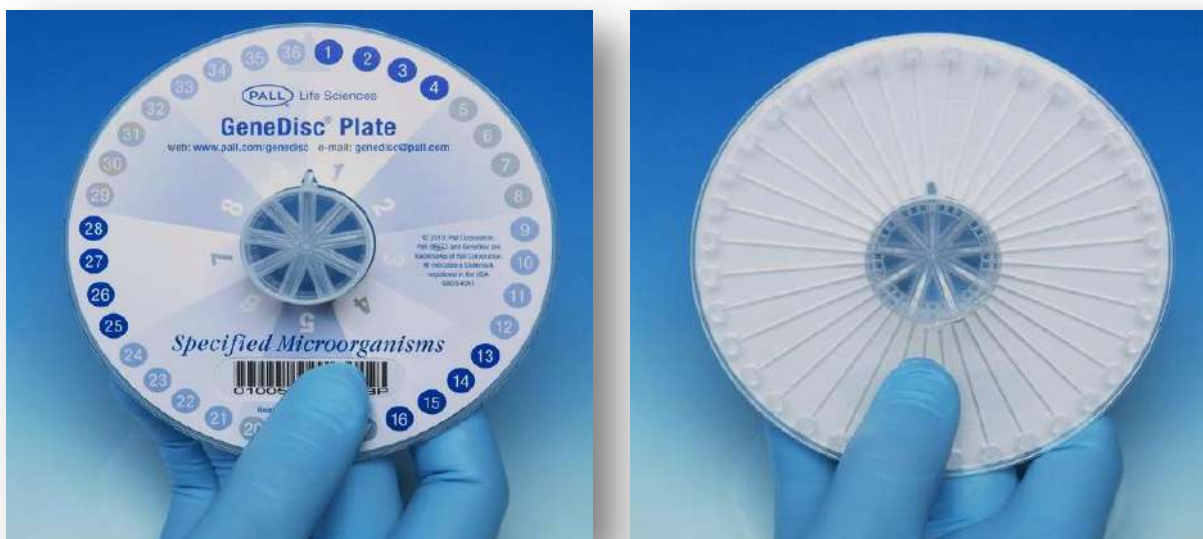
Una vez obtenida la muestra de ADN, una alícuota de éste es transferida a la placa de GeneDisc (Figura 2). Esta placa se asemeja a un disco de DVD, pero en realidad tiene incorporada un sistema microscópico de distribución de fluidos que brinda las muestras sembradas en la parte central del disco a las cavidades periféricas donde se desarrolla la reacción de PCR. Dos de los reactivos esenciales para el ensayo (*primers* y sondas) ya están pre-empaquetados en el disco y listos para su uso. La parte superior del disco tiene una cavidad central subdividida en 9 sectores independientes. La parte inferior contiene 36 cavidades de ensayo conectadas en grupos de a cuatro a los 9 sectores centrales a través de microcanales. Las muestras de ADN sembradas en los sectores centrales son uniformemente distribuidas a las cavidades periféricas por un sistema incorporado de vacío. Existen discos de 6, 9, y 12 sectores dependiendo el número de muestras que se desea analizar. Cada grupo de cavidades de ensayo periférico cuenta con controles positivos y negativos ya incorporados.

El tercer y último paso es colocar el disco dentro del aparato de PCR (Figura 3). El instrumento puede analizar 1 hasta un máximo de 8 discos simultáneamente. El diseño modular permite flexibilidad en el número de muestras a analizar. Como se dijese anteriormente los resultados se obtienen en menos de 3 horas contando desde el

momento en que las muestras son filtradas inicialmente.

El sistema que se muestra en la Figura 2 (máxima configuración) puede procesar un máximo de 96 muestras simultáneamente. La primera aplicación en el mercado para la industria farmacéutica es para el ensayo de microorganismos específicos. Otras aplicaciones más generales, incluyendo la detección universal de bacterias, levaduras y hongos están en desarrollo.

Figura 2. GeneDisc para la detección de 6 microorganismos específicos (de acuerdo al ensayo descrito en el capítulo 62 de la farmacopea americana). La parte superior del disco muestra la cavidad central dividida en 9 sectores para sembrar las muestras (izquierda). La parte inferior del disco muestra el sistema de capilares que distribuye las muestras en las cavidades de ensayo ubicadas en la periferia del disco (derecha).



(Con permiso de Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)

Figure 3. Instrumento para PCR cuantitativo GeneDisc mostrando la unidad central con monitor y 7 módulos de PCR adicionales. (Con permiso de Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)



Validación Inicial del Sistema GeneDisc como Instrumento de Control de Calidad Microbiológica en la Industria Farmacéutica

El objetivo más importante en la validación de un método microbiológico alternativo con el propósito de ser usado en ensayos de productos ambientes farmacéuticos es la demostración de equivalencia o superioridad con el método tradicional correspondiente. El proceso de validación debe identificar los riesgos, si los hay, de utilizar el nuevo ensayo como reemplazo del método descrito en la farmacopea, como así también evaluar y definir los parámetros tradicionales y operativos del nuevo sistema. Una guía de la validación de métodos microbiológicos rápidos se puede encontrar en las farmacopeas ^[50-51] como así también en documentos publicados por asociaciones profesionales ^[52].

El autor y colaboradores evaluaron el sistema GeneDisc por un período de más de 12 meses siguiendo las directivas descritas en el trabajo técnico número 33 de la asociación parenteral americana ^[52]. Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios y confirmaron que esta tecnología es simple de operar, robusta y altamente confiable ^[53]. La evaluación fue hecha usando los discos diseñados para los ensayos descritos en el capítulo 62 de la farmacopea norteamericana^[1] que permiten determinar la ausencia, u ocurrencia limitada de microorganismos específicos que pueden ser detectados en una muestra farmacéutica bajo condiciones de ensayo adecuadas. Estos discos pueden ser utilizados adicionalmente para los ensayos descritos en otras secciones de las guías regulatorias, tales como los descritos en los capítulos 51, 2.6.12, y 35.2 de las farmacopeas americana, europea y japonesa, respectivamente, como así también en el ensayo de eficacia de desinfectantes descrito en el documento europeo EN 1040 ^[1-3, 54].

La Tabla 7 detalla las ventajas más destacables del sistema GeneDisc para su aplicación microbiológica en el control de calidad de productos farmacéuticos en la industria farmacéutica

Tabla 7. Ventajas del Sistema GeneDisc

- Detección rápida de contaminación microbiana
- Intervención humana minimizada
- Procesamiento de 9 muestras por disco en menos de 1 hora. El tiempo total desde la filtración de la muestra a la obtención de los resultados en menor a 3 horas.
- Rapidez en los resultados posibilitan la toma de decisiones y la ejecución de medidas correctivas en forma eficiente
- Obtención simultánea de datos de 6 especies microbianas por muestra
- Entrenamiento mínimo y eficiente del personal de laboratorio
- Validación comparativamente simple de los parámetros instrumentales
- Operatividad satisfactoria demostrado en otras industrias (alimentación, cosméticos, medio ambiente, etc)
- Acortamiento en la liberación de productos al mercado, disminución de riesgo y mejor control de calidad

A medida que más y mejores tecnologías de microbiología rápida son presentadas al mercado, el uso de estos sistemas en monitoreo ambiental va a ir creciendo y la aprobación por parte de las autoridades regulatorias va a ser más fácil de obtener. Muchas de las tecnologías que inicialmente fueran desarrolladas para el análisis de muestras farmacéuticas, pueden ser adaptadas para el uso en el monitoreo ambiental (Tabla 8).

Tabla 8

Compañía	Instrumento	Aplicaciones
Bertin	Coriolis	Recuperación de microorganismos flotando en el aire en un medio líquido
Bioscience International	SAS-PCR	Recuperación de microorganismos flotando en el aire en un medio líquido
BioMérieux	BacT/ALERT	Detección de CO ₂ producido por microorganismos presentes en productos o en muestras ambientales
BioVigilant	IMD-A 200-1, IMD-A 220-4	Tecnología óptica para la detección de partículas y microorganismos en muestras de aire
Celsis	RapiScreen, AKuScreen	Detección de ATP por bioluminiscencia en productos
Chemunex	Chem Scan RDI	Citometría en fase sólida para el ensayo de muestras filtrables
Lonza	microCompass	Ensayo por transcripción reversa y PCR para muestras filtrables
Millipore	Milliflex Quantum	Ensayo basado en el uso de reactivos fluorescentes para muestras filtrables
Pall	Pallchek	Detección de ATP por bioluminiscencia en productos, excipientes, agua y medio ambiente
Pall	GeneDisc	qPCR
Particle Measuring Systems	BioLaz	Tecnología óptica para la detección de microorganismos en muestras de aire
Rapid Micro Biosystems	Growth Direct System	Sistema automatizado de lectura temprana del número de unidades formadoras de placas para muestras filtrables.

Conclusiones

Como se discutiera en las secciones precedentes, existe una gama variada de tecnologías microbiológicas rápidas, y una gran mayoría de estos sistemas pueden ser empleados en el monitoreo microbiológico ambiental. La implementación de estas tecnologías presenta la posibilidad de obtener resultados en forma instantánea o en pocas horas en vez de días requeridos por las técnicas tradicionales. La obtención de resultados en forma rápida brindará un control más efectivo del área de producción.

A medida que estas tecnologías se vayan adoptando, será necesario llevar a cabo un análisis profundo de las ventajas y desventajas que presenta cada una de ellas. Una ventaja obvia, como se mencionara anteriormente, es la rapidez observada en la obtención de resultados y el incremento en el control de calidad y la seguridad de los productos manufacturados. Una desventaja muy importante es el costo asociado a la adquisición y uso (descartables, reactivos, mantenimiento, etc.) de estos sistemas. Si bien estas desventajas y ventajas deben ser evaluadas, las tecnologías microbiológicas rápidas siguen progresando y su uso se expandirá sin duda alguna en el futuro cercano.

Referencias

1. United States Pharmacopoeial (USP) 34-NF 29 (2011) United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, MD.
2. European Pharmacopeia (2010) 7th edition. Council of Europe: Strasbourg, France.
3. The Japanese Pharmacopoeia (2006) 15th edition, the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.
4. Working document QAS/09.297/Rev.2 WHO Good Practices for Pharmaceutical Microbiology Laboratories World Health Organization 2010.
5. Farmacopea Argentina. Séptima Edición. 2002. Capítulo 1020 "Buenas prácticas de fabricación y control".
6. ANEXO I *Guía para inspectores: Buenas prácticas de fabricación de medicamentos*. Disposición 2372/2008 – Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. ANMAT. Abril 2008. Salud Pública.
7. ANEXO II *Clasificación de deficiencias de cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación de medicamentos*. Disposición 2372/2008 - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. ANMAT. Abril 2008. Salud Pública.
8. Salamán-Byron, A.L.(2006) *Implementation of Microbial Environmental Monitoring Program for Non-Aseptic Pharmaceutical Processes*. American Pharmaceutical Rev. Jul/Aug 2006 issue, Volume 9, Issue 5, p. 10-15
9. Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica Título 21 Parte 211 (CFR 21 Part 211) Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals.
10. Parenteral Drug Association (PDA) Journal of Parenteral Science and Technology; Technical Report No. 13, Volume 44 #S1 (1990); *Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program*
11. Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report No. 13 (Revised) *Fundamentals of an Environmental Monitoring Program* (2001). PDA J of Pharm Sci Technol. 55 Supplement TR#1 (5).
12. PhRMA Environmental Monitoring Work Group (1997) "Microbiological Monitoring of Environmental Conditions for Nonsterile Pharmaceutical Manufacturing", Pharm. Technol., March, pp. 58-74.
13. Denoya, C.D., S.T. Colgan, and G.C. du Moulin. 2006 "Alternative Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry: The Need for a New Microbiology Curriculum". American Pharmaceutical Review 9(6):10-18.
14. Korczynski, M.S. 2005. *The Importance of Emerging rapid Methods technology to Regulators and Industry* (Chapter 3). In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, ed. Miller M., pp273-290. Parenteral Drug Association, Bethesda, MD.
15. Moldenhauer, J. 2005. *Introduction to Rapid Microbial Methods for Environmental Monitoring in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA
16. Denoya, Claudio D. (2010). "Alternative Microbiological Methods and New Pharmaceutical Microbiology Curriculum". In *Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices* (M. R. Saghee, T. Sandle and E. C. Tidswell, eds.), First Edition, Business Horizons Pharmaceutical Publishers, New Delhi, India. Chapt. 20, pp. 491-518.
17. Ceresa, L. (2005) "Pall System" in *Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook* (J. Moldenhauer, Ed), Volume II ISBN Number: 1-930114-88-5 Parenteral Drug Association Books, Bethesda
18. Denoya, C.D., J. Reyes, E. Dawson, D. Sessoms, M. Baumstein, and J. Shabushnig. (2010) "A Rapid Microbiological Assay to Monitor the Effectiveness of a Vaccine Injector Sanitization Following a Microbial Challenge Procedure" *American Pharmaceutical Review*, 13(4) May/Jun, pages 54-61
19. Stanley, P.E. (1989) *A concise beginner's guide to rapid microbiology using adenosine triphosphate (ATP) and luminescence*. In *ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology*, P. E. Stanley, B. J. McCarthy, and R. Smither, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1-11.
20. Kramer, M., Suklje-Debeljak, H., and Kmetec, V. (2008) *Preservative Efficacy Screening of Pharmaceutical*

- Formulations using ATP Bioluminescence*. Drug Dev and Industrial Pharmacy, 34: 547-557.
21. Nielsen, P. and Van Dellen E. *Rapid Bacteriological screening of cosmetic raw materials by using bioluminescence* (1989) Journal of the Association of Analytic Chemists, 72(5) 708-711.
 22. Lehninger, *Principles of Biochemistry* (2008). Fifth edition Eds. David L. Nelson, Michael. M. Cox, WH Freeman publishers. New York, NY.
 23. Chappelle E.W and Levin, G.V. (1968) *Use of the Firefly Bioluminescence Reaction for Rapid Detection of Counting Bacteria*. Biochemical Medicine, 2: 41-52.
 24. White, E.W., McCapara, F., Field, G.F, and McElroy W.D. (1961). *The Structure and Synthesis of Firefly Luciferin*. Journal of American Chemical Society, 83: 2402- 2403.
 25. Denoya, C.D. (2009) “*Technical Assessment of a Bioluminescence-based Rapid Microbiological Method (RMM) for the Detection of Microbial Contaminants in Pharmaceutical Samples*” Podium presentation. European Meeting of the Parenteral Drug Association, Berlin, Germany, Febrero 2-5, 2009.
 26. *Testing Procedures and Applications for the Pallchek Rapid Microbiology System*”, USTR 2358, Pall Life Sciences, Port Washington, New York.
 27. Chen, L; W. Snapp, S. Fennell, M. Boquet, C. Seeger, J. Reyes, and C. Denoya (2009) “*Evaluation of Rapid Microbiological Methods in Environmental Monitoring: The Use of a Device that Collects Air Samples into Liquid Media*” Poster presentado en el 4th Annual Global Conference on Pharmaceutical Microbiology, Parenteral Drug Association, Bethesda, Maryland, October 5-8, 2009
 28. Denoya, C; J. Reyes, M. Ganatra, and D. Eshete. (2011) “*Rapid Sterility Testing Using ATP Bioluminescence-based Pallchek™ Rapid Microbiology System*” in *Rapid Sterility Testing* (J. Moldenhauer, Ed.) Parenteral Drug Association Books, Bethesda, MD Capitulo 17, p. 433-461.
 29. BacTAlert website. <http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/home>
 30. du Moulin, GC, Kielpinski G, Prinzi S, Duguid J, and Price A. 2005. *Detection of microbial contaminants for cell therapy products: Validation of an automated microbial detection system*. In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, ed. Miller M., pp273-290. Parenteral Drug Association, Bethesda, MD.
 31. Growth Direct website <http://www.rapidmicrobio.com/>
 32. Strauss, D. 2005. *Rapid Environmental Monitoring Using the Growth Direct Test in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.
 33. Deutschmann, Sven (2011) “*Qualification and Validation of an Automated Rapid Growth Based System for In-Process-Control and Water Testing.*” Parenteral Drug Association, Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA.
 34. Moldenhauer, J. y P. Yvon. 2005. *Environmental Monitoring Using the Scan RDI in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.
 35. Smith, R.; M. von Tress; C. Tubb; and E. Vanhaecke. 2010. “*Evaluation of the ScanRDI_ as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeial Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection*” PDA J Pharm Sci and Tech 2010, 64:356-363.
 36. M. J. Miller,, H. Lindsay, R. Valverde-Ventura, and M. J. O’Conner. *Evaluation of the BioVigilant_ IMD-A™, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles*. Part I. Review of the Technology and Comparative Studies with Conventional Methods PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 63, No. 3, May–June 2009 245-258.
 37. Miller M., M. R. Walsh,, J. L. Shrake, R. E. Dukes, and D. B. Hill. *Evaluation of the BioVigilant_ IMD-A™, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles*. Part II. Case Studies in Environmental Monitoring during Aseptic Filling, Intervention Assessments, and Glove Integrity Testing in Manufacturing Isolators PDA Journal of

38. Gadal, P. and Q. Desjonqueres. 2009. *Active Microbial Air Sampling with Coriolis μ Air Sampler and ScanRDI in Environmental Monitoring. A Comprehensive Handbook*, Volume III (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.
39. Denoya, C. 2009. "Nucleic Acid Amplification–based Rapid Microbiological Methods: Are these technologies ready for deployment in the pharmaceutical industry?" *American Pharmaceutical Review*, 12(4):12-21.
40. Bustin, S.A. "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems" (2002) *J. Molec. Endocrinology* 29:23-39
41. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction" (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-50.
42. www.nobelprize.org Este sitio describe el premio Nobel otorgado al descubridor de la técnica de PCR.
43. Skinner, D.D. and C. D. Denoya. (1993). "A Simple DNA Polymerase Chain Reaction Method to Locate and Define Orientation of Specific Sequence in Cloned Bacterial Genomic Fragment" *Microbios* (Cambridge, UK) 75:125-129.
44. Denoya, C. D.; R. W. Fedechko, E. W. Hafner, H. A. I. McArthur, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, K. Stutzman-Engwall, R. G. Wax, and W. C. Wernau. 1995. "A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis*: Its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins" *Journal of Bacteriology* 177:3504-3511
45. Wang, P., C. D. Denoya, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, K. K. Wallace, R. Digate, S. Patton, N. Banavali, G. Schuler, M. K. Speedie, and K. A. Reynolds. 1996. "Cloning and characterization of the gene encoding 1-cyclohexenylcarbonyl CoA reductase from *Streptomyces collinus*" *Journal of Bacteriology* 178:6873-6881.
46. Florova, G., C. D. Denoya, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, and K. A. Reynolds. 1998. "Cloning, Expression, and Characterization of a Type II 3-Dehydroquinate Dehydratase Gene from *Streptomyces hygroscopicus*" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 350(2):298-306
47. Jimenez, L.; Smalls, S.; Ignar, R. (2000) *Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples*. *J. Microbiol. Methods* 41 (3), 259 – 65.
48. Jimenez, L.; Ignar, R.; D'Aiello, R.; Grech, P. (2000) *Use of PCR analysis for sterility testing in pharmaceutical environments*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 8 (1), 11–20.
49. Kawai, M.; Matsutera, E.; Kanda H.; Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. (2002). *16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2), 699 –704
50. United States Pharmacopeia, Chapter <1223> "Validation of Alternative Microbiological Methods". USP 34–NF 29 (2011) United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD.
51. European Pharmacopeia, Chapter 5.1.6 "Alternative Methods for Control of Microbiological Quality" (2010) 7th edition. Council of Europe: Strasbourg, France.
52. Parenteral Drug Association (PDA). "Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods". PDA J Pharm Sci & Technol 2000; 54(3), suppl. Technical Report 33:2-9.
53. Denoya, C. (2011) "An innovative qPCR technique applied to Rapid Microbiological testing". Podium presentation. Annual Meeting of the Parenteral Drug Association, San Antonio, TX, April 11-15, 2011.
54. European Committee for standardization (2005): *European standard EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements*.
55. Jeanne Moldenhauer. *Establishing Ongoing Monitoring, Surveillance and Evaluation Programs*. Vectech Pharmaceutical Consultants. Farmington Hills. USA.

Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos

Luis Jiménez

- *Introducción*
- *¿Por qué los métodos rápidos son una alternativa a los métodos convencionales o estándar?*
- *Tecnologías:*
 - Bioluminiscencia de ATP*
 - Conteo Directo de Células Viabiles*
 - Citometría de Flujo*
 - Impedancia y Producción de Gas*
 - Tecnología de PCR*
 - Identificación Genética por secuenciación del ADN*
 - Microarreglos de ADN*
 - Inmunoensayos*
 - Autofluorescencia*
 - Prueba de endotoxinas*
- *Cómo Validar un Método Rápido*
- *Conclusión*

Introducción

Con la creciente demanda para optimizar la fabricación y las pruebas de control de calidad de procesos farmacéuticos, los métodos microbiológicos rápidos se han utilizado para analizar las muestras del medio ambiente, materias primas, productos intermedios, procesos, y muestras de productos terminados. El objetivo de este capítulo es describir los diferentes tipos de tecnologías, métodos y protocolos disponibles para los microbiólogos farmacéuticos que trabajan en la investigación y en el control de calidad de productos farmacéuticos. La discusión se limitará a los estudios, trabajos de validación y protocolos publicados en la literatura científica.

Diferentes capítulos de las farmacopeas internacionales describen los métodos de prueba necesarios para analizar productos estériles, productos farmacéuticos no estériles, y la vigilancia ambiental ⁽¹⁻⁵⁾. Sin embargo, estos no son los únicos métodos para las pruebas de control de calidad de las muestras de productos farmacéuticos. Hay varias tecnologías que pueden utilizarse para este tipo de análisis. Sin embargo, para aplicar estas tecnologías para las pruebas de rutina, los estudios de validación deben llevarse a cabo para documentar y apoyar la equivalencia con los métodos de compendio. Los capítulos informativos de la USP y UE ^(6, 7) describen los parámetros necesarios para demostrar la equivalencia con los métodos de compendio. Además, otras directrices para la validación de métodos rápidos han sido publicados por la *Parenteral Drug Association*

(PDA) ⁽⁸⁾.

A pesar del interés por la industria y los organismos reguladores, los métodos rápidos se dirigen lentamente a formar parte de la rutina de análisis microbiológico de control de calidad de productos farmacéuticos. Hay algunas iniciativas de los organismos reguladores para promover el uso de estas tecnologías para optimizar el control del proceso y las pruebas de control de calidad. Estas tecnologías se pueden dividir en tres categorías diferentes. La primera categoría es una de crecimiento microbiano basado en una señal que puede ser detectada después de una etapa de enriquecimiento. La bioluminiscencia de Adenosina Trifosfato (ATP) es un ejemplo de esta categoría. La segunda categoría es la detección directa de las células microbianas que pueden ser visualizadas y diferenciadas mediante citometría de flujo. La tercera categoría es el análisis de componentes celulares, donde la detección de un componente específico de la célula indicará la presencia de los microorganismos. Un ejemplo de esta categoría es el análisis de sustancias de endotoxinas o secuencias específicas de ADN.

¿Por qué los métodos rápidos son una alternativa a los métodos convencionales o estándar?

Cuando los microorganismos contaminan los productos farmacéuticos, los métodos estándar se realizan para cuantificar, detectar, o identificar el número y tipo de microorganismos presentes en un lote determinado ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

Los métodos estándar se basan en el enriquecimiento, la incubación y el aislamiento de los microorganismos de las muestras de productos y ambientales. Debido a los largos tiempos de incubación, la manipulación continua, y el tiempo de los procedimientos, los resultados se obtienen normalmente dentro de 6-8 días. Se ha informado recientemente de que los métodos estándar subestimaron las comunidades microbianas presentes en los ambientes farmacéuticos y cuartos limpios ⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Esto ha sido demostrado en las muestras de agua, placas de contacto de las superficies, y muestras de aire de diferentes instalaciones de fabricación de productos farmacéuticos y los entornos de cuartos limpios. La bioluminiscencia de ATP, los conteos viables, la tecnología de autofluorescencia, análisis del ADN y las técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) han demostrado que una parte no cultivable de la comunidad microbiana en ambientes farmacéuticos es viable y no es detectada por los métodos convencionales. Por lo tanto, estas nuevas tecnologías proporcionan una resolución más alta y mantienen una mayor discriminación entre las especies microbianas. La información precisa de los tipos y número de microorganismos en ambientes farmacéuticos dará lugar a la aplicación de los procesos que minimicen la distribución microbiana, la viabilidad y la proliferación.

Por otra parte, la identificación de varios aislamientos ambientales de los ambientes farmacéuticos utilizando los métodos convencionales de identificación ha demostrado ser incorrecta (Tabla 1). La identificación se realiza mediante técnicas bioquímicas (fenotípica), los lípidos y/o análisis de ADN. Los análisis de ADN proporcionan la mejor reproducibilidad, sensibilidad, precisión y resolución. Para desarrollar las medidas correctivas adecuadas cuando resultados fuera de la especificación son obtenidos, la identificación microbiana precisa es necesaria si la fuente de contaminación tiene que ser determinada. Una acción correctiva no es eficaz si la información incorrecta se utiliza para implementarla.

Sobre la base de estos estudios es evidente que en algunos casos, los métodos convencionales no son exactos y precisos para contribuir al proceso de la optimización de la manufactura, análisis, y lanzamiento. Aunque los métodos estándar son valiosos y aportan información sobre los números, géneros microbianos, y las especies, estos métodos fueron desarrollados para la identificación de microorganismos en muestras clínicas ⁽¹⁶⁾. La mayoría de las muestras clínicas se originan a partir de fluidos o tejidos humanos, que son ricos en nutrientes y con temperaturas de exposición de 35-37°C. Las muestras ambientales, por ejemplo, materias primas, productos terminados, aire, agua, equipos de hisopos y placas de contacto, tomado de las instalaciones de producción no son ricos en nutrientes (oligotróficas) y la temperatura fluctúa por debajo y por encima de la temperatura ambiente. La actividad baja de agua y cambios dramáticos en el pH también afectan al estrés microbiano. Por otra parte, la fabricación de productos farmacéuticos abarca procesos físicos, tales como mezcla, compresión, filtrado, calefacción, encapsulación, granulación, recubrimiento y secado ⁽¹⁷⁾. Estos procesos exponen a las células microbianas a un estrés ambiental continuo.

Tabla 1. Caracterización microbiana de bacterias utilizando diferentes sistemas de identificación.

Especies	Fenotípica 1	Fenotípica 2	Lípidos	Genética
<i>Bacillus cereus</i>	no	si	si	si
<i>Burkholderia cepacia</i>	si	no	si	si
<i>Enterobacter cloacae</i>	si	si	no	si
<i>Escherichia coli</i>	si	si	si	si
<i>Micrococcus luteus</i>	no	si	no	si
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	si	si	si	si
<i>Shigella flexneri</i>	no	si	no	si
<i>Staphylococcus aureus</i>	no	no	no	si
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	si	no	no	si
<i>Ochrobactrum ananthropi</i>	si	si	si	si
<i>Ralstonia pickettii</i>	no	si	no	si
<i>Streptococcus salivarius</i>	no	no	no	si
<i>Corynebacterium xerosis</i>	no	no	no	si
<i>Kokuria rosea</i>	no	no	no	si

Los microorganismos sobreviven en esas condiciones por la adaptación a la falta de nutrientes y otras fluctuaciones del medio ambiente mediante la realización de diferentes estrategias de supervivencia ⁽¹⁸⁾. Los microorganismos no siempre son metabólicamente activos y su reproducción no es constante. Por ejemplo, las bacterias gram-positivas, tales como *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. desarrollan estructuras latentes llamadas esporas. Por otra parte, las bacterias gram-negativas como *E. coli*, *S. typhimurium* y otros bacilos gram-negativos convierten en células viables pero no cultivables (VNC). Estas células bacterianas que no crecen en las placas de cultivo, pero mantienen su viabilidad, pasan por la etapa viables no cultivables, pero aún son capaces de causar infecciones graves para los seres humanos. Varios estudios han demostrado que las células microbianas en ambientes farmacéuticos han cambiado el tamaño de la célula, los perfiles enzimáticos y fisiológicos como una respuesta a las fluctuaciones del medio ambiente ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Estas respuestas son inducidas por el estrés y permiten a los microbios reparar el daño causado. Respuestas similares han sido reportadas por las bacterias expuestas a las soluciones de drogas causando importantes cambios morfológicos y de tamaño. Las células bacterianas cargadas en diferentes tipos de productos inyectables han demostrado diversos cambios en su metabolismo, los perfiles enzimáticos, y los cambios estructurales que interferían con su identificación mediante pruebas bioquímicas normalizadas. Además, las bacterias que pasan por una etapa de hambre de supervivencia son capaces de penetrar filtros de 0.2 / 0.22 micrones que se supone que deben retener todas las especies bacterianas.

Por lo tanto, el uso de perfiles enzimáticos y la asimilación de carbono, para discriminar y identificar los microorganismos de las muestras del medio ambiente podría, en algunos casos resultar en perfiles desconocidos que no proporcionarán ninguna información significativa sobre los géneros y especies microbianas presentes. En los ambientes farmacéuticos, la información sobre los géneros y especies de un contaminante microbiano proporcionará información valiosa sobre las posibles fuentes de contaminación que llevarán a que se puedan implementar acciones correctivas efectivas.

También se ha demostrado que la recuperación de los microorganismos a partir de muestras ambientales, incluyendo entornos de cuartos limpios se ha mejorado mediante el uso de los medios de cultivo de bajos nutrientes ⁽¹²⁾. La recuperación de los microorganismos de las muestras de agua farmacéutica se incrementa por el uso de un medio de cultivo bajo nutrientes como el medio de R2A ⁽²²⁾. La necesidad de una fase de recuperación del estrés se demuestra por los tiempos de incubación más largos y medios bajos de nutrientes. En el caso de las esporas bacterianas dañadas por el calor, la recuperación y el crecimiento se basa en la

composición de los medios de cultivo, el pH, la temperatura de incubación, y el tiempo de incubación. Aunque el desarrollo y la aplicación de las actuales buenas prácticas de manufactura (siglas en inglés, cGMP) ha mejorado el control de procesos en ambientes farmacéuticos, la contaminación microbiana sigue siendo una de las principales causas de retirada de productos en todo el mundo. Algunas de las razones de la falta de cumplimiento de las directrices cGMP son:

- Las malas prácticas de saneamiento
- La falta de personal
- La falta de formación
- La falta de recursos
- Falta de instalaciones para las pruebas de control de calidad
- Ausencia de proceso de validación
- Ausencia de proceso de documentación
- La falta de comprensión de los principios básicos microbiológicos

Cuando los productos están contaminados, el crecimiento microbiano tendrá un impacto negativo en la integridad del producto creando una grave amenaza sanitaria para los consumidores. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar y aplicar métodos rápidos microbiológicos. Los métodos rápidos han demostrado ser sensibles, precisos, robustos, y proporcionan resultados más rápidos que pueden indicar problemas en los procesos y sistemas utilizados en ambientes farmacéuticos. La detección temprana de contaminación microbiana permite la minimización de las pérdidas de producción y optimización de la evaluación de riesgos.

Las buenas prácticas de fabricación son un proceso dinámico y continuo que se basan en la aplicación de los últimos avances tecnológicos para la manufactura de productos farmacéuticos con el fin de ofrecer productos eficaces y seguros. El análisis de control de calidad es uno de los aspectos más importantes de los procesos de control de productos farmacéuticos. Por lo tanto, reduciendo el tiempo de prueba, se aumenta el rendimiento, con un lanzamiento más rápido del producto donde se optimiza el control de los procesos.

Tecnologías

Bioluminiscencia de ATP

El ATP es el compuesto más importante de alta energía presente en una célula microbiana. El ATP tiene una importante función en la célula microbiana, proporcionando la fuente de energía para impulsar la viabilidad microbiana y el crecimiento. La tecnología de bioluminiscencia se basa en la reacción del complejo de la enzima luciferasa luciferina, en presencia de oxígeno y magnesio, con el ATP liberado de las células microbianas que resulta en la producción de luz.

Luciferasa de luciérnaga

Magnesio



La luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP liberado. La emisión de luz se mide mediante a través de un luminómetro. Varios estudios han demostrado la aplicabilidad de la bioluminiscencia de ATP para el control de calidad. Los primeros estudios se han basado en la laboriosa preparación de la muestra para la extracción del ATP a partir de células microbianas y la adición manual de reactivos. Una vez que el ATP se extrae y se reacciona con la enzima, las muestras se agregan a un luminómetro para detectar la producción de luz.

Durante el durante los años 1990 las mejoras en las tecnologías de instrumentación han resultado en, la automatización completa y procesamiento de muestras múltiples, la lisis celular, y la adición de reactivos permitiendo la reducción en la manipulación de las muestras y los procedimientos largos de extracción. Algunos instrumentos han desarrollado la información cuantitativa, pero en otros sólo se indica la presencia o ausencia de células microbianas en las muestras después de una etapa de incubación.

Los ensayos de bioluminiscencia se han utilizado para el monitoreo rápido de la calidad del agua en los sistemas farmacéuticos⁽²³⁾. De todas las materias primas presentes en una formulación farmacéutica, el agua es extremadamente susceptible a la contaminación microbiana. Por lo tanto, el análisis microbiológico del agua es un parámetro crítico en el control de calidad. Los métodos estándar de análisis de agua incluyen la filtración de membrana con tiempos de incubación entre 48 horas, con placa de agar heterotrófico, o a 72 horas, con los medios de R2A.

Después de una evaluación de desempeño de 4 meses, un análisis cuantitativo de bioluminiscencia ha demostrado proporcionar un recuento total en 24 horas de las bacterias presentes en muestras de agua tomadas de un sistema de ultra filtración de agua, sistema de circulación de agua caliente y agua fría del grifo. La correlación general entre el ensayo y los métodos estándar es mayor que 82%. Después de la filtración de membrana por el analista, el sistema al mismo tiempo lisa las células microbianas en los filtros, añade los reactivos, y determina cuantitativamente el número de células en una muestra dada. Las muestras de agua con números microbianos de 1 a 75 unidades formadoras de colonias (UFC)/ 100 ml se cuantifican con precisión. Sin embargo, la cuantificación exacta no es posible con las muestras de agua que contiene más de 75 UFC/ 100 ml. La linealidad entre el ensayo de bioluminiscencia y los métodos estándar se demuestra cuando el sistema se enfrenta con las muestras de agua contaminadas con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Otro sistema cuantitativo diferente de bioluminiscencia ha demostrado ser eficaz para el monitoreo de agua purificada y agua para inyección en una planta farmacéutica. Después de una evaluación de un mes, se obtienen recuentos comparables con el sistema y los métodos estándar ⁽²⁴⁾. Los recuentos microbianos se obtienen en 24 horas. El sistema combina un ensayo de filtración de membrana especializada con bioluminiscencia y análisis de imagen mejorada para los propósitos de cuantificación. La linealidad, precisión y reproducibilidad del sistema se ha demostrado mediante el análisis de muestras de agua contaminadas con *Burkholderia cepacia*.

Además de las aguas de calidad farmacéutica, una gran variedad de formulaciones farmacéuticas se han validado mediante un ensayo cualitativo de bioluminiscencia. Los diferentes tipos de sistemas de administración de medicamentos farmacéuticos tales como cápsulas, tabletas, líquidos, sólidos y emulsiones fueron encontrados compatibles con el sistema. Para validar el ensayo, dos pasos se deben realizar antes de la adición de las muestras con diferentes concentraciones de microorganismos. Debido a que el enriquecimiento de las suspensiones de la muestra es necesario para llevar a cabo el análisis, el caldo de enriquecimiento debe estar libre de sustancias indígenas de ATP para evitar una reacción positiva falsa. En segundo lugar, la suspensión de la muestra en caldo no debe aumentar ni inhibir la reacción de la bioluminiscencia para indicar que la luz emitida después de la finalización del ensayo no es un artefacto, pero que sí es una señal real que registra como positivo o negativo.

Este sistema de bioluminiscencia ha demostrado que permiten la investigación de alto rendimiento de más de 180 muestras por día. Por otra parte, tiempos de 24 a 48 horas de detección fueron obtenidos para el análisis de muestras de producto terminado ^(25, 26). Debido a la necesidad de una etapa de enriquecimiento de incubación, la optimización del ensayo requiere el desarrollo de diferentes medios de enriquecimiento para superar la naturaleza antimicrobiana de los diferentes principios activos farmacéuticos (Tabla 2). Por ejemplo, para una recuperación óptima de las bacterias, levaduras y hongos, en productos farmacéuticos que contienen compuestos halogenados, era necesario añadir tiosulfato de sodio a los medios de enriquecimiento o caldos (R, MR, y el caldo de MR2) (Tabla 3). Por otra parte, los diferentes nutrientes se añaden también para optimizar la recuperación del *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, la glicina, y para el hongo, por ejemplo, acetato de sodio y glicerol (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempos de detección (en horas) de la contaminación microbiana por bioluminiscencia ATP.

	Producto A		Producto B	
Medio de enriquecimiento	R caldo	MR caldo	TAT Caldo	R caldo
<i>P. aeruginosa</i>	24	24	24	24
<i>S. aureus</i>	48	24	24	24
<i>E.coli</i>	24	24	24	24
<i>S. typhimurium</i>	24	24	24	24
<i>C. albicans</i>	24	24	24	24
<i>A. niger</i>	24	27	48	27

	Producto C		Producto D	
Medio de enriquecimiento	R caldo	Leethen/ Lecithin	MR caldo	Leethen/ Lecithin
<i>P. aeruginosa</i>	72	24	48	24
<i>S. aureus</i>	96	24	48	24
<i>E.coli</i>	48	24	48	24
<i>S. typhimurium</i>	72	24	48	24
<i>C. albicans</i>	72	24	48	24
<i>A. niger</i>	72	48	72	48

La optimización de la detección de contaminación microbiana en algunos productos requiere el uso de caldo Lethen con lecitina. Otro ensayo de ATP se basa en la diferenciación del ATP extracelular libre con el ATP intracelular para determinar las comunidades microbianas viable en ambientes de cuartos limpios ⁽¹⁴⁾. El ATP extracelular es degradado utilizando una enzima somasa de ATP. Las muestras de los ambientes de cuartos limpios presentan niveles más bajos de ATP en comparación con las muestras obtenidas de las salas comunes. Sin embargo, una gran parte de las muestras no dan las unidades formadoras de colonias (UFC) en el medio de soja caseína, pero las placas son positivas para el ATP intracelular. La contaminación microbiana viable en cuartos limpios se puede detectar con este ensayo que podría dar una mejor indicación de la presencia de la biomasa microbiana.

Las pruebas de esterilidad se ha demostrado que se realizaron con un ensayo de bioluminiscencia, que demostró la recuperación de microorganismos en estrés ^(27, 28). El sistema rápido de Milliflex fue utilizado para detectar la cantidad de microorganismos presentes en una muestra. El método es basado en la regeneración de las células microbianas en los filtros con la identificación del genotipo que resultó ser robusta y reproducible. Como requisito previo para la validación de esta prueba de esterilidad rápida, se demostró que un medio sólido de cultivo promovió el crecimiento de microorganismos en estrés. Después de evaluar los diferentes medios de crecimiento, se encontró que el agar de sangre de Schaedler contiene las mejores propiedades promotoras del crecimiento entre los agares analizados para la prueba de esterilidad rápida.

Conteo Directo de Células Viables

El recuento microbiano en muestras de productos farmacéuticos se puede realizar utilizando el conteo de placas y microscopía directa con tintes de viabilidad. El recuento directo de las distintas células microbianas mediante microscopía de epifluorescencia ha demostrado que se detectan las bacterias activas en el agua purificada utilizada en los procesos de fabricación ⁽¹³⁾. Las muestras han sido procesadas a través de un filtro de 0.45 micrones para retener las bacterias. Las bacterias en el filtro se tiñen con diferentes tipos de colorantes. Los tintes son específicos para los diferentes tipos de reacciones metabólicas en la célula microbiana. Tinción fluorescente con 5-ciano-2 ,3-cloruro de tetrazolio ditolyl (CTC) y diacetato de 6 carboxifluoresceína (6CFDA) ha detectado células bacterianas con la respiración y la actividad esterasa, respectivamente. Los resultados con el CTC y 6CFDA han indicado que gran número de bacterias en el agua purificada han retenido la actividad

fisiológica, mientras que un gran porcentaje no puede formar colonias en medios de cultivo convencionales. Por lo tanto, los recuentos microbianos por medio de conteos directos son siempre más altos que el conteo de placas estándar. Sin embargo, el análisis de microscopía de epifluorescencia es un procedimiento lento que en el momento no permite la detección rápida de muestras múltiples.

Citometría de Flujo

Varios estudios han demostrado la aplicabilidad del uso de "marcadores de viabilidad y de citometría de flujo para el recuento rápido de los microorganismos en el agua de calidad farmacéutica" (29-33). El marcador de viabilidad más comúnmente utilizado se basa en la reacción de las bacterias con el tinte ChemChrome B (CB). La preparación de la muestra consiste en el filtrado a través de una membrana de 0.45 micrones seguido por la marcación de la célula y escaneo láser. El tinte, un tipo éster con fluoresceína, se convierte en un producto fluorescente, un derivado de fluoresceína libre, por la actividad de esterasas intracelulares después de haber sido captado por las células microbianas previamente capturados por la filtración de membrana. Las células microbianas con una membrana celular intacta sólo mantienen el derivado de fluoresceína. Las bacterias se enumeran a continuación, utilizando un láser de barrido, que ha demostrado ser sensible a una sola célula en una muestra y demostró que el conteo fue más sensitivo que el método de conteo de heterótrofos de placa. Resultados similares han sido encontrados por tinción fluorescente con la filtración por membrana usando DAPI, otros medios de crecimiento, y citometría de flujo. En otro estudio, muestras de un sistema de intercambio de iones, sistema de ósmosis inversa, y agua purificada fueron analizados y procesados. Los análisis de microscopía de fluorescencia de las muestras de agua utilizando DAPI se han traducido en mayores recuentos microbianos. De los dos medios de cultivo utilizados por la filtración de membrana, R2A ha mostrado un mayor número de células microbianas. Sin embargo, el número de bacterias obtenidas por el instrumento de escaneo láser parece ser más alto que el conteo de placas estándar. Análisis de agua del grifo, agua purificada y agua para inyección (WFI) en varios sitios farmacéuticos también ha demostrado que la citometría de flujo es equivalente al método de filtración por membranas convencionales. Estudios de recuperación en cultivos puros demuestran una buena correlación entre los métodos, con un coeficiente de correlación menor de 0.97 para todos los organismos analizados (bacterias vegetativas, esporas, hongos y levaduras). Sin embargo, ninguno de los estudios informó el procesamiento múltiple de muestras de agua.

Estudios adicionales han sido recientemente realizados en el antibiótico macrólido, espiramicina, mediante citometría de fase sólida (33). Con el método convencional de la placa heterotrófica en paralelo, la recuperación completa sólo se ha obtenido de los organismos resistentes a espiramicina. Los microorganismos que fueron sensibles a los antibióticos se han mantenido inhibidos o estresados por la acción de la espiramicina y no crecen en las placas de cultivo, pero son detectados por citometría de flujo. Estos resultados indican, además, la insuficiencia de los métodos estándar para recuperar microorganismos estresados o heridos.

El análisis de la carga microbiana de las muestras en cultivos celulares de células mamíferas también se han llevado a cabo mediante citometría de flujo (34). En lugar del tiempo de incubación requerido de 7 días para las pruebas estándar de carga biológica, los análisis se completan dentro de 4 horas. El ensayo es lo suficientemente sensible para detectar de 5 a 15 UFC / ml después de 4 horas. La ventaja de un análisis rápido es que los resultados se conocen antes de que un lote es procesado. En algunos casos, la contaminación microbiana ha sido encontrado después de los lotes son procesados dando lugar a enormes pérdidas financieras.

Las pruebas de esterilidad de productos farmacéuticos garantizan la seguridad y la estabilidad de una formulación dada. El producto debe estar libre de contaminación microbiana de lo contrario puede causar daños al paciente. Dos métodos de prueba de esterilidad, la prueba de esterilidad ScanRDI® rápida y la Farmacopea de los Estados Unidos / Farmacopea Europea / Farmacopea Japonesa (siglas en inglés, USP / EP / JP), se compararon con respecto a los límites de detección de la presencia de microorganismos viables en soluciones acuosas a niveles de inoculación bajo. Ocho microorganismos fueron evaluados. El método ScanRDI® resultó ser numéricamente superior y estadísticamente no inferior a la prueba de esterilidad compendio (USP / EP / JP) con respecto a los límites de detección para todos los organismos analizados (35).

Impedancia y Producción de Gas

Cuando los microorganismos crecen en medios de enriquecimiento, como resultado del metabolismo microbiano algunos de los sustratos se convierten en productos finales de alta carga ⁽³⁶⁾. Estos sustratos son generalmente sin carga o carga débil, pero se transforman durante el crecimiento microbiano. Debido a su naturaleza, los productos finales aumentan la conductividad de los medios de cultivo provocando una disminución en la impedancia. La impedancia es la resistencia al flujo de una corriente alterna que pasa por un material conductor.

El tiempo de detección de impedancia (T_d) es cuando la resistencia al flujo de una corriente alterna indica el crecimiento de un microorganismo como resultado de cambios en el medio de cultivo. Varios estudios han demostrado la aplicabilidad de la impedancia directa para la detección de la actividad microbiana en productos farmacéuticos. Debido a que la impedancia es una tecnología de crecimiento dependiente, el medio debe ser elegido para permitir el crecimiento de microorganismos y también para ser optimizado para la señal eléctrica. Sustratos para este tipo de medios de cultivo serán descargados o débilmente cargados, tales como la glucosa que cuando se convierte en ácido láctico aumenta la conductividad de los medios de cultivo. Sin embargo, una modificación actual llamada impedancia indirecta monitorea el metabolismo microbiano mediante la medición de la producción de dióxido de carbono. El dióxido de carbono retirado del medio de crecimiento resulta en una disminución de la conductividad. El uso de la impedancia indirecta permite el uso de los medios de cultivo que no puedan generar una respuesta eléctrica óptima utilizando el método directo.

Una buena correlación entre el tiempo de detección directa de la impedancia (T_d) y recuento total de colonias que se ha obtenido en un caso de suspensiones de *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404 y *P. aeruginosa* ATCC 9027 ⁽³⁶⁾. Resultados similares se han encontrado con las suspensiones de los microorganismos de ensayo tratados durante períodos variables de contacto con las concentraciones de diferentes agentes antimicrobianos. La única diferencia es que el tiempo de detección de las células tratadas se extiende más que las no tratadas. El ensayo es lo suficientemente sensible para detectar bacterias, levaduras y hongos.

Las Impedancia ha sido comparada con la técnica de epifluorescencia directa (DEFT-MEM) y el ATP de bioluminiscencia para la detección de contaminación microbiana en las células expuestas a diferentes agentes antimicrobianos ⁽³⁷⁾. Cuando las suspensiones de *S. aureus* ATCC 6538 y *C. albicans* ATCC 10231 tratadas con clorhexidina fueron analizadas se obtuvo una buena respuesta. La aplicación de impedancia para la investigación farmacéutica requiere el desarrollo de las curvas de crecimiento para los diferentes microorganismos estudiados. El sistema no puede procesar múltiples muestras.

Un sistema con un alto rendimiento y capaz de procesar múltiples muestras es el BacT / ALERT. El sistema consta de un módulo con una incubadora estándar de 4 cajones. Un total de 240 muestras pueden ser analizadas simultáneamente. El sistema utiliza un sensor colorimétrico y la luz reflejada para determinar la cantidad de dióxido de carbono (CO_2) que se disuelve en el medio de cultivo. Si los microorganismos están presentes en la muestra, el CO_2 se produce cuando los organismos metabolizan los sustratos en el medio de cultivo. Cuando el crecimiento de los microorganismos produce CO_2 , el color del sensor en la parte inferior de cada botella de cultivo cambia y la luz se refleja en el sensor. Esta información se transmite al equipo en el que se compara con el nivel inicial de CO_2 en la botella. La muestra se determina positiva basada en la tasa de producción de CO_2 . Si después de un determinado número de días el nivel de CO_2 no cambia de manera significativa, la muestra se determina negativa. Las células se examinan con puntos de datos graficados cada 10 minutos. Los estudios demostraron el uso del sistema para determinar la esterilidad de los productos de terapia celular ⁽³⁸⁾. La prueba de esterilidad de los condrocitos autólogos cultivados ha sido validada mediante la demostración de la recuperación de todos los microorganismos inoculados. El estudio demostró la viabilidad del sistema para detectar continuamente la contaminación por bacterias, levaduras y hongos.

Tecnología de PCR

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información genética que controla el desarrollo de una célula microbiana. El ADN determina el potencial genotípico y fenotípico de la célula microbiana. Con los últimos avances en genómica, donde más de 100 genomas microbianos han sido secuenciados, la posibilidad de utilizar la información genética para la detección y discriminación de los microorganismos es interminable. Las tecnologías genéticas pueden aumentar la resolución y la especificidad de la detección e identificación microbiana en ambientes farmacéuticos. Una de las tecnologías basadas en el análisis de ADN es la reacción en

cadena de PCR.

La PCR amplifica secuencias específicas de ADN a lo largo del genoma microbiano. Por ejemplo, un conjunto de cebadores de ADN se utiliza para apuntar la secuencia específica que va ser amplificada (Tabla 3).

Tabla 3. Pasos del ensayo de reacción de RCP.

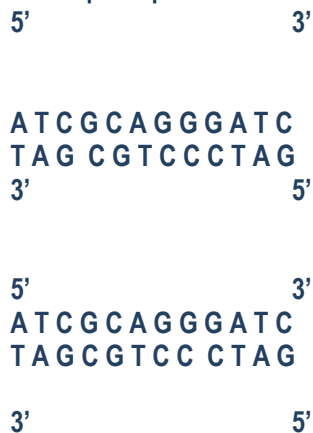
1) Doble hélice desnaturalizado por calentamiento



2) Los cebadores están alineados a las secuencias complementarias del ADN



3) Cebadores son extendidos por la polimerasa de ADN derivando dos cadenas de ADN



La reacción de PCR se lleva a cabo en 3 etapas diferentes. En primer lugar, el ADN se desnaturaliza por el calor. En segundo lugar, los cebadores se alinean a las secuencias complementarias de las hebras de ADN. En tercer lugar, los cebadores son extendidos por la enzima ADN polimerasa que resulta en dos hebras diferentes. Los tres pasos se repiten de nuevo por un número determinado de ciclos, por ejemplo de 30 a 35. Una vez la secuencia es amplificada, los productos se detectan mediante electroforesis en gel ⁽³⁹⁻⁴⁵⁾. Sin embargo, hay sistemas que se basan en la detección de la fluorescencia de los productos amplificados en tiempo real ^(46, 47).

En los laboratorios farmacéuticos ensayos basados en PCR han demostrado ser capaz de detectar *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus brasiliensis*, y secuencias eubacteriales después de un período de incubación ⁽³⁹⁻⁴⁷⁾. Los analistas, las materias primas, equipos, o el agua introducen algunos de estos microorganismos en ambientes farmacéuticos. Por otra parte, cuando los analistas no siguen las buenas prácticas de laboratorio se convierten en las principales fuentes de contaminación microbiana en cuartos limpios y fabricación aséptica. La detección rápida de los microorganismos objetables resulta en la implementación de las acciones correctas para evitar que la contaminación se repita. Los tiempos de detección con las PCR van desde 24 a 27 horas. Se trata de una reducción significativa en comparación con el tiempo de detección estándar de 5-7 días. Por otra parte, la detección de alto rendimiento de las muestras es posible utilizando un formato de 96 pocillos.

La simplificación de los análisis de PCR para el control de calidad farmacéutica se logra mediante el uso de una tableta y un formato de cuentas. Los reactivos de PCR, incluyendo cebadores, se combinan en forma de tableta, mientras que en las cuentas se proporcionan los reactivos necesarios para la reacción de PCR, pero sin los cebadores de ADN ⁽³⁹⁻⁴⁷⁾. Las preparaciones largas y manejo de reactivos individuales no son necesarios debido a los formatos de tableta y de cuentas. La extracción del ADN microbiano de los medios de enriquecimiento se realiza en solo dos pasos. Para las bacterias y levaduras, una preparación de la muestra en una solución de Tris-EDTA-Tween 20 con proteinasa K a 35 °C resulta en un ADN de alta calidad mientras para las muestras con hongos se tiene que hacer una ebullición de las muestras en una solución de SDS durante 1 hora. Con los últimos avances en la genómica microbiana, la disponibilidad de secuencias de los cebadores de ADN son ilimitadas lo cual permite el desarrollo de cebadores universales para las bacterias, levaduras y hongos. Un estudio reciente ha demostrado la aplicabilidad de detectar la contaminación bacteriana de las pruebas de esterilidad mediante un ensayo de PCR ⁽⁴³⁾. El estudio se basa en el carácter universal y la inclusión de las secuencias de ADN bacteriano que codifica para genes ribosomales. Los cebadores dirigidos a estas secuencias de ADN bacteriano común son capaces de la detección rápida de muestras de contaminación bacteriana. Es posible también la detección simultánea de múltiples secuencias de ADN microbiano en muestras farmacéuticas ^(45, 46).

La PCR también se ha utilizado para el seguimiento de las muestras de agua en los procesos de fabricación farmacéutica⁽¹¹⁾. Secuencias de ADN ribosomal se amplificaron con cebadores universales bacterianos. Después de la amplificación, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (gradiente de desnaturalización de electroforesis en gel (DGEE)) para detectar los productos amplificados. Esto permitirá la separación de los fragmentos de ADN de la misma longitud, pero con diferentes secuencias. Después de la separación, los geles se analizan para generar un perfil densitométrico. La secuenciación de los fragmentos amplificados ha revelado que las bacterias dominantes en las muestras de agua no son cultivables en los medios de cultivo estándar. La mayoría de las especies de bacterias cultivables se han encontrado para ser relacionado con *Bradyrhizobium* spp., *Xanthomonas* spp. y *Stenotrophomonas* spp., mientras que las especies dominantes de bacterias incultivables no se han caracterizado. Estos estudios mostraron la capacidad limitante de los métodos estándar para determinar y caracterizar la estructura de la comunidad microbiana presente en los ambientes farmacéuticos.

Identificación Genética por secuenciación del ADN

Cuando se detecta contaminación microbiana en una muestra farmacéutica, la caracterización de los tipos de microorganismos por géneros y especies es un criterio importante para determinar el origen de la contaminación.

El primer paso en la identificación fenotípica de los microorganismos en los laboratorios farmacéuticos se realiza mediante el método de tinción de Gram. Este método se basa en las diferencias químicas y estructurales entre las membranas y paredes celulares de las bacterias gram positivas y gram negativas. Otras pruebas bioquímicas que se hacen son, por ejemplo, la catalasa y la prueba de oxidasa. En otros casos una suspensión

estandarizada del cultivo se inocula en tiras, tarjetas o placas de microtitulación. Estos sistemas se basan en la detección de la actividad enzimática por diferentes tipos de enzimas como oxidasas y los perfiles de utilización de compuestos de carbono. Sin embargo, nuevas pruebas genéticas ofrecen una mayor resolución y discriminación para la identificación microbiana. La Tabla 1 muestra una comparación de la identificación fenotípica y genotípica de especies bacterianas mediante técnicas bioquímicas (fenotípica), lípidos, y los métodos genéticos. El método genético demostró una mayor precisión y reproducibilidad que los lípidos y análisis bioquímicos. Se obtuvieron resultados similares con cepas aisladas de diferentes ambientes farmacéuticos ^(11, 48). El análisis de secuenciación de ADN proporciona un mayor nivel de resolución, precisión y determinación que el análisis de lípidos. Varios estudios demostraron que las cepas que no fueron identificadas por análisis fenotípico están correctamente caracterizados por el análisis de secuencia del ADN ribosomal ^(11,48,49). Esto proporciona una información precisa para el seguimiento de la fuente de contaminación en ambientes farmacéuticos y caracterización de la comunidad microbiana que permite acciones correctivas más rápidas y eficaces.

Microarreglos de ADN

La miniaturización de los análisis genéticos, como la PCR y la hibridación de ADN utilizando microarreglos de ADN se ha informado que se utilizaron para determinar la composición microbiana de muestras farmacéuticas y cuartos limpios ^(50, 51). Los microarreglos proporcionan una alternativa automática, precisa y de alto rendimiento. El ensayo se divide en cuatro procesos: la preparación de muestras, detección, y el análisis de los resultados ⁽⁵²⁾. En general, los oligonucleótidos (oligos) sondas son secuencias cortas de ADN o ARN de diferentes tamaños inmovilizado en un soporte sólido como laminillas de vidrio, gel o de silicona. La unión de los oligos al soporte sólido requiere el diseño de matrices de la sonda en las localizaciones predeterminadas. En el ejemplo que se muestra en la Tabla 4 se ven las fichas antes de la reacción.

Tabla 4. Microarreglo de las sondas de ADN, antes de la adición de la muestra.

90 muestras en un microarreglo inmovilizadas en soporte sólido

La Tabla 5 muestra que una reacción positiva se indica por el desarrollo de un punto negro en la matriz de microarreglo. Donde hay una reacción positiva, hay un punto negro. Un microarreglo se puede utilizar hasta 30 veces sin deterioro notable de la señal de hibridación. Miles de oligonucleótidos pueden ser inmovilizados en una

laminilla, lo que permite la detección simultánea de una gran variedad de microorganismos en una sola muestra.

Tabla 5. Microarreglo de las sondas de ADN, después de la adición de la muestra. Oligonucleótidos con secuencias de ADN hibridizado detectó 18 muestras positivas

	•							•
		•			•			
•							•	
			•	•	•			
						•		•
				•				
•		•			•	•	•	•

En comparación con los análisis de PCR, con los microarreglos de ADN se puede detectar la presencia de miles de genes simultáneamente. La primera aplicación de microarreglos de ADN para el control de calidad farmacéutica y de procesamiento fue reportado por Streefalnd et al. ⁽⁵³⁾. La vacuna contra la tos ferina se basa en el crecimiento de las células de *Bordetella pertussis* en biorreactores. La vacuna es una suspensión de células inactivadas por calor conjunto. La estructura bacteriana que proporciona la mayor parte de la protección inmunológica son las proteínas de la membrana situadas en la membrana externa de la pared celular. Se estudiaron diferentes condiciones de crecimiento las cuales fueron utilizados para optimizar la expresión de estas proteínas. El proceso de cultivo es el más importante paso durante la manufacture de la vacuna porque la calidad del producto es controlado de una manera precisa. Los genes más importantes para controlar la calidad del producto fueron identificados. Más de 3.000 genes fueron inmovilizados en los microarreglos. Los perfiles de expresión indicaron las condiciones de crecimiento óptimo para maximizar la producción de proteínas. De esta manera fueron capaces de entender cómo las alteraciones ambientales influyen en la fisiología celular y la calidad del producto.

En otro estudio La Duc et al. ⁽⁵⁰⁾ realizaron un análisis exhaustivo de las bacterias en superficies de cuartos limpios en donde 107 muestras individuales fueron analizadas utilizando la secuenciación de ARN y microarreglos. Sin embargo, a causa de la biomasa microbiana bajo, varias muestras se agruparon para optimizar el proceso. Los microarreglos demostraron una comunidad más diversa en comparación con la secuenciación del ARN. Algunas de las familias de bacterias que se encontraron por ambos métodos eran miembros de la *Flexibacteraceae*, *Oxalobacteraceae* y *Streptococcaceae*. La clonación y secuenciación de ADN detectaron miembros de la *Ralstoniaceae*, *Pseudomonodaceae* y *Aurantimonadaceae* mientras los microarreglos de ADN detectaron miembros de la *Dictoglomaceae* y familias *Leuconostocaceae*. Ambos métodos fueron capaces de detectar cambios en la composición de la comunidad microbiana basada en diferentes variaciones del medio ambiente. Una gran diversidad de la comunidad microbiana anaeróbica se observó mediante el análisis de microarreglos, incluso después de un riguroso programa de mantenimiento de limpieza de los cuartos limpios.

Inmunoensayos

Aunque los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ampliamente utilizados en análisis clínicos y de alimentos, no fue sino hasta recientemente que estos métodos fueron aplicados al control de calidad farmacéutica. Las pruebas de ELISA se realizan utilizando distintos formatos. El formato más común para el análisis de productos farmacéuticos se basa en la inmovilización de anticuerpos de alta afinidad, específicos para diferentes tipos de microorganismos, en la superficie de los pocillos. La muestra se aplica luego al pozo y se incuban. Un anticuerpo conjugado a enzima se añade para reaccionar con el microorganismo capturado. Esto dará lugar a la formación de un conjugado de anticuerpo-microorganismos "sándwich". Para desarrollar una señal de la detección, un sustrato químico se añade a reaccionar con la enzima en el conjugado. Si hay un microorganismo en la muestra, una reacción de color se desarrollará. La ausencia microbiana se indica por la ausencia de color. El uso de un formato de placa de microtitulación de 48 a 96 pozos permite la detección de alto rendimiento de las muestras de productos farmacéuticos. Estudios demostraron que la presencia del *S. aureus* fue detectada en 24 horas en muestras de productos farmacéuticos contaminados con cultivos puros y mixtos⁽⁵⁴⁾. Estos resultados indican que los ensayos son lo suficientemente específicos para detectar un solo microorganismo en la presencia de otras especies microbianas. Otros microorganismos como *P. aeruginosa* y *S. typhimurium* también se detectaron rápidamente mediante la prueba ELISA (Tabla 6)

En comparación con el tiempo de detección de 5 días, utilizando los métodos estándar, el método ELISA se encontró más eficaz reduciendo el tiempo de detección y mano de obra. Además, el procesamiento múltiple y análisis de las muestras ha sido posible gracias al formato utilizado. Otro estudio de validación se llevó a cabo para comparar los análisis de ELISA con los métodos estándar⁽⁵⁵⁾. Otros productos probados incluyen una amplia gama de productos farmacéuticos tales como jarabes para la tos, laxantes, tratamientos de úlcera, los preparados para lactantes, crema antiséptica, así como algunos de los ingredientes farmacéuticos. Este estudio confirmó la sensibilidad de ELISA para el análisis de diferentes productos y muestras.

Tabla 6. La detección de contaminación microbiana utilizando inmunoensayos.

Producto	Bacteria	Dilución	Tiempo de Detección (días)	
			Método Estándar	ELISA
A	<i>S. aureus</i>	1:100	4-5	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1:100	4-5	1
	<i>S. typhimurium</i>	1:100	4-5	1
B	<i>S. aureus</i>	1:10	4-5	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1:10	4-5	1
	<i>S. typhimurium</i>	1:10	4-5	1
C	<i>S. aureus</i>	1:10	4-5	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1:10	4-5	1
	<i>S. typhimurium</i>	1:10	4-5	1
D	<i>S. aureus</i>	1:10	4-5	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1:10	4-5	1
	<i>S. typhimurium</i>	1:10	4-5	1
E	<i>S. aureus</i>	1:10	4-5	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1:10	4-5	1
	<i>S. typhimurium</i>	1:10	4-5	1

Autofluorescencia

El análisis cuantitativo mediante citometría de flujo y bioluminiscencia de ATP resultaron en una rápida enumeración de microorganismos en muestras de productos farmacéuticos. Sin embargo, ambos ensayos son destructivos y no aportan para el análisis de alto rendimiento. Por otra parte, en la cuantificación del ensayo de bioluminiscencia los resultados no son precisos y confiables más allá de los 75 UFC/100 ml. La citometría de flujo ofrece una amplia gama de cuantificación. Sin embargo, la filtración a través de una membrana de 0.45 micrones, con 25 milímetros de diámetro puede ser un factor limitante. Si es necesaria la identificación

microbiana, el análisis de la muestra debe basarse en el recuento de enriquecimiento de la placa estándar para el aislamiento e identificación de las colonias microbianas necesarias para ser caracterizado.

Un análisis cuantitativo no destructivo de muestras farmacéuticas se puede realizar mediante el sistema de crecimiento directo™⁽⁵⁶⁾. El sistema utiliza una imagen de área digital que no ha sido amplificada para la detección del crecimiento de las células microbianas en agua, productos, materias primas, muestras de aire y contacto con la placa. La prueba utiliza los medios de cultivo estándar de crecimiento y de filtración por membrana. El ensayo no requiere adición de reactivos. Las muestras se aplican a las membranas, se colocan en las placas de cultivo, y entonces se colocan en el instrumento el cual las incuba y toma las imágenes usando un detector con un dispositivo de carga acoplada. Las colonias microbianas se detectan mediante la autofluorescencia intrínseca de las células microbianas. Esta autofluorescencia se origina en las moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina y riboflavina presente en las células microbianas.

Las muestras ambientales mostraron un ahorro de tiempo de 50-80% para el análisis microbiológico⁽⁵⁶⁾. Además, en comparación con los métodos tradicionales, el crecimiento directo™ permite la enumeración rápida de las células microbianas. Por ejemplo, *E. coli* se enumeró en un plazo de 12 horas usando el método estándar, mientras que el crecimiento directo™ se completó en 3 o 5 horas. El ahorro de tiempo para la cuantificación de la levadura y el hongo es 80% y 70%, respectivamente. El sistema conserva las ventajas clave de las pruebas tradicionales, ya que no mata los microbios que detecta, las microcolonias podrían seguir dividiendo después de la detección temprana para formar las macrocolonias. Esto facilita la identificación posterior de las colonias aisladas en los medios de cultivo.

Otro sistema que utiliza la autofluorescencia es el BioVigilant IMD-A, el cual es una nueva tecnología de espectroscopia óptica para la detección, clasificación y cuantificación de las partículas viables y no viables en tiempo real. Estudios comparativos con los sistemas convencionales de muestreo de aire se realizaron recientemente^(15,57). Los estudios han demostrado que el IMD BioVigilant-A es capaz de enumerar ambas partículas viables y no viables simultáneamente y de forma instantánea en una variedad de ambientes clasificados y no clasificados. La capacidad de esta tecnología para proporcionar datos en tiempo real puede ofrecer a la industria una ventaja sin precedentes sobre las muestras basadas en el crecimiento en medios de cultivo para el seguimiento del estado del control microbiológico en entornos de fabricación de productos farmacéuticos.

Prueba de endotoxinas

Las bacterias Gram-negativas son la principal causa de contaminación de los productos estériles en los Estados Unidos⁽²²⁾. Las endotoxinas son importantes componentes estructurales de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Si están presentes en biofarmacéuticos inyectables, pueden desencadenar reacciones que conducen a la morbilidad extrema, es decir, fiebre, o la mortalidad⁽⁵⁸⁾. Algunas de las fuentes potenciales de contaminación por endotoxinas es el agua, excipientes tales como disolventes, agentes espesantes, agentes quelantes, antioxidantes, agentes reductores, los preservativos, y aditivos especiales. El análisis de endotoxinas se realiza por tres tecnologías básicas, que se basan en el altamente sensible Lisado de Amebocito del Limulus (LAL). Estas tecnologías son el coágulo de gel, el análisis de punto final, y los ensayos cinéticos. En el coágulo de gel una muestra cargada en un tubo que contiene un lisado de sensibilidad específica se incuba durante 60 minutos y los resultados son basados en la formación de coágulos sólidos en los tubos⁽⁵⁸⁾. El problema con esta tecnología es que no es ni cuantitativa ni sensible. Estudios recientes han demostrado la validación de un ensayo cromogénico-cinético portátil⁽⁵⁸⁾. El sistema es un ensayo cromogénico-cinéticos basado en la detección de pirógenos midiendo la intensidad del color en relación con las concentraciones de endotoxina presentes en una muestra. Los cartuchos de poliestireno contienen todos los reactivos necesarios para realizar la prueba. El análisis de muestras se realiza en 15 minutos. El ensayo fue capaz de la cuantificación rápida de endotoxinas en agua y muestras de productos biofarmacéuticos. Un producto de terapia celular también fue validado con el sistema, con resultados casi idénticos⁽⁵⁹⁾. Sin embargo, se encontraron algunas sustancias inhibitorias en las muestras que requieren diluciones adicionales para validar los ensayos.

¿Cómo Validar un Método Rápido?

Como se mencionó en la introducción, las agencias reguladoras publicaron varios capítulos sobre la validación de métodos microbiológicos alternativos o rápidos ^(6,7). En los capítulos se describen algunos de los parámetros recomendados para demostrar la equivalencia con los métodos estándar o convencionales. Algunos de los parámetros descritos en estos documentos son los siguientes:

- Sensibilidad
- Exactitud
- Especificidad
- Linealidad
- Límite de detección
- Vigor
- Resistencia
- Alcance
- Precisión

Todos estos parámetros son aplicables a las diferentes tecnologías discutidas previamente. Por ejemplo, si se está validando un método cualitativo que indica la presencia de la ausencia de microorganismos, entonces tiene que hacer la precisión, exactitud, límite de detección, vigor y sensibilidad. Estudios adicionales de alcance y linealidad no son necesarios porque no se cuentan el número de microorganismos en la muestra.

El plan de validación debe ser completo y detallado. En primer lugar se describe el método, explicando la tecnología y componentes. A continuación, se procede a desarrollar el protocolo para la instalación, operación y desempeño del sistema. La información proporcionada por el fabricante del sistema es el comienzo de la recogida y verificación de toda la documentación necesaria. En la Tabla 7 se puede ver el protocolo utilizado en el sistema rápido de endotoxina previamente discutido.

Tabla 7. Protocolo para la Validación de un método rápido para la prueba de endotoxinas.

Calificación de la Instalación	Calificación de la Operación	Calificación del Rendimiento
• Prueba de Sistema de verificación de documentación • Lista de equipo y componentes • Verificación de la calibración del Instrumento • Verificación de las Utilidades • Verificación de la instalación	• Prueba de Sistema de comprobación automática • Prueba de iniciación de prueba de aceptabilidad • Un cartucho de prueba se ha insertado en el lector antes de que la temperatura alcance 37°C. • Prueba de Aceptabilidad de entrada de Información. • Códigos no válidos de número de lote y de calibración de los cartuchos se entraron en el sistema. • Prueba de la operación batería • Después de que el detector esté apagado y desconectado de la fuente de alimentación, que completa el sistema de auto-test y asciende a 37°C utilizando la energía de la batería después de que se vuelva a encenderla.	• Prueba de funcionamiento interno de la bomba. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba Cinética del Ruido. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba de Verificación y Calibración del método. • Las muestras de 25 microlitros de agua para inyección se agregan a 4 pozos en la prueba cartucho. • Prueba de Verificación de Resultados de Endotoxinas. • Las muestras de 25 microlitros de una solución de 0.1 UE / ml de endotoxinas se añaden a 4 pozos en el cartucho de prueba. • Comparación del método convencional con el método rápido.

Básicamente, la calificación de la instalación es demostrar que el instrumento o sistema ha sido instalado de acuerdo con las especificaciones indicadas por el fabricante. La calificación de la operación es demostrar que el equipo instalado opera basado en los límites predeterminados cuando se utiliza según los procedimientos establecidos durante la validación. Por último, la calificación de desempeño demuestra que el instrumento lleva a cabo los análisis según los criterios establecidos y que los resultados obtenidos son correctos y reproducibles. Al final las muestras son examinadas con el método rápido y el método estándar para demostrar la equivalencia. El método alternativo debe ser tan bueno o mejor que el método estándar. Por ejemplo, el método alternativo para la prueba de endotoxinas ha demostrado ser más sensible, preciso y más rápido que el método estándar ^(58,59).

Conclusión

Sobre la base de estudios publicados en revistas científicas, hay varias nuevas tecnologías disponibles que pueden sustituir o complementar los métodos microbiológicos convencionales para las pruebas de control de calidad de las muestras de productos farmacéuticos. Los métodos rápidos han demostrado ser eficaces, fiables, sensibles, y equivalentes a los ensayos microbiológicos regulares. Por otra parte, debido a la reciente demostración de bacterias incultivables en ambientes farmacéuticos y los diferentes tipos de respuestas fisiológicas a las fluctuaciones ambientales, los métodos rápidos proporcionan una descripción más completa de la comunidad microbiana presente en los productos, el medio ambiente, personal y materias primas. Dado que la contaminación microbiana es un evento esporádico en los ambientes farmacéuticos, el análisis rápido de los lotes proporciona una rápida liberación de aproximadamente el 99% de las muestras analizadas. Cuando la contaminación microbiana se encuentra, los métodos específicos rápidos, como el inmunoanálisis o la tecnología de PCR pueden analizar las muestras para detectar la presencia de microorganismos patógenos objetables con alta capacidad de procesamiento. Sin embargo, los sistemas cuantitativos a la fecha no tienen una alta capacidad de rendimiento de procesamiento.

Como se ha demostrado por los estudios científicos publicados, la validación que muestra la equivalencia entre los métodos convencionales y rápidos se debe realizar antes de la aplicación. Algunas de las tecnologías son más precisas que los métodos microbiológicos convencionales. Por ejemplo, la enumeración y detección de bacterias que no crecen en los medios de cultivo estándar crean una situación donde se requiere cambios en las especificaciones. Sin embargo, los cambios en las especificaciones se pueden documentar si hay una ventaja significativa en el uso del método alternativo. Varios términos, tales como la viabilidad microbiana se redefine como por los datos concretos en apoyo de los cambios que indican que un microorganismo puede ser viable, pero no es capaz de crecer en medio de enriquecimiento convencionales. Por ejemplo, en los estudios de citometría de flujo, conteo directo, y de PCR varias especies microbianas se han encontrado ser miembros predominante de la comunidad microbiana, pero no han sido aislados o detectados utilizando los métodos estándar. Sin embargo, esto no debe desalentar el uso de estas tecnologías, sino por el contrario crear un entorno en el que su uso va a desarrollar la información adicional que puede ser utilizada para mejorar significativamente los procesos de control microbiológico. En el siglo XXI, con los avances en ciencias de la computación, la automatización, la química combinatoria, la genómica y la medicina, la microbiología de control de calidad requiere menor tiempo de rotación, mayor resolución y sensibilidad sin comprometer la eficacia. Estas nuevas tecnologías mejoran la capacidad de un sistema de control de calidad para la evaluación de riesgos y control de procesos. Entre otras características, un sistema ideal de microbiología rápida estará integrado por un alto rendimiento, identificación rápida, facilidad de uso, alta capacidad de procesamiento. Sin embargo, en un futuro no muy lejano el laboratorio de microbiología de control de calidad puede tener un instrumento para análisis de agua y otros para el recuento microbiano, la vigilancia ambiental, pruebas de esterilidad, y la identificación microbiana. Los métodos rápidos pueden complementar o sustituir los ensayos microbiológicos estándar para proporcionar una mayor resolución y análisis de las comunidades microbianas presentes en los ambientes farmacéuticos resultando en el mejoramiento de la vigilancia en contra de la contaminación microbiana.

Referencias:

1. United States Pharmacopeia. Chapter 71. *Sterility test*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 65-70, (2011).
2. United States Pharmacopeia. Chapter 61. *Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 52-56, (2011).
3. United States Pharmacopeia. Chapter 61. *Microbiological examination of nonsterile products: test for specified microorganisms*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 56-61, (2009).
4. United States Pharmacopeia. Chapter 1116. *Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments*, U.S. Pharmacopeial Convention. Rockville, Maryland, 633-641, (2011).
5. European Pharmacopeia. Chapter 2.6.1. *Sterility*, European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 155-158, (2009).
6. United States Pharmacopeia. Chapter 1223. *Validation of alternative microbiological methods*. U.S. Pharmacopeial Convention: Rockville, Maryland, 731-733, (2009).
7. European Pharmacopeia. Chapter 5.1.6. *Alternative methods for control of microbiological quality*. European Pharmacopeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 532-543, (2009).
8. PDA Technical Report Number 33. *Evaluation, validation, and implementation of new microbiological testing methods*. J. Parent Sci. Tech. 54, (2000).
9. Casey, W., Muth, H., Kirby, J., and Allen, P. *Use of nonselective preenrichment media for the recovery of enteric bacteria from pharmaceutical products*. Pharm. Technol. 22: 114-117, (1998).
10. Palmieri, M.J., Carito, S.L., and Meyer, J. *Comparison of rapid NFT and API 20E with conventional methods for identification of gram-negative nonfermentative bacilli from pharmaceutical and cosmetics*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2838-3241, (1998).
11. Kawai, M., Matsutera, E., Kanda H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. *16S Ribosomal DNA-Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*. Applied and Environmental Microbiology 68: 699-704, (2002).
12. Nagarkar P., Ravetkar, S.D., and Watve, M.G. *Oligophilic Bacteria as Tools To Monitor Aseptic Pharmaceutical Production Units*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 1371-1374, (2001).
13. Kawai, M., Yamaguchi, N., and Nasu, N. *Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process*. J. Appl. Microbiol.; 86: 496-504, (1999).
14. Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T., and Kern, R. *ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean room facilities*. J. Microbiol. Methods; 52:367-377, (2003).
15. Miller M.J., Walsh, M.R., Shrake, J.L., Dukes, R.E., Hill, D.B. *Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part II. Case studies in environmental monitoring during aseptic filling, intervention assessments, and glove integrity testing in manufacturing isolators*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 63, 259-83, (2009).
16. Cundell, A.M. *Review of the media selection and incubation conditions for the compendial sterility and microbial limit tests*. Pharmacopeial Forum 28: 2034-2041, (2002).
17. Underwood, E. *Ecology of microorganisms as it affects the pharmaceutical industry*. In W.B. Hugo and A.B. Russell eds. Pharmaceutical Microbiology, 6th Edition, Blackwell Science, Oxford, England, 339-354 (1998).
18. Roszak, D.B., and Colwell, R.R. *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiol. Rev.

51:365-379, (1987).

19. Sundaram, S., Mallick, S., Eisenhuth, J., Howard, G., and Brandwein, H. *Retention of water-borne bacteria by membrane filters. Part II: Scanning electron microscopy (SEM) and fatty acid methyl ester (FAME) characterization of bacterial species recovered downstream of 0.2/0.22 micron rated filters.* PDA J Pharm Sci Technol 55:87-113, (2001).
20. Papapetropoulou, M., and Papageorgakopoulou, N. *Metabolic and structural changes in Pseudomonas aeruginosa, Achromobacter CDC, and Agrobacterium radiobacter cells injured in parenteral fluids.* PDA J. Pharma. Sci. Technol. 48:299-303, (1994).
21. Whyte, W., Niven, L., and Bell, N.D. *Microbial growth in small-volume pharmaceuticals.* J. Parenteral Sci. Technol. 43: 208-212, (1989).
22. Jimenez, L. *Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments.* PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 61, 383-399, (2007).
23. Scalici, C., Smalls, S., Blumberg, S., English, D., and Jimenez, L. *Comparison of Millipore Digital Total Count System and standard membrane filtration procedure to enumerate microorganisms in water samples from cosmetic/pharmaceutical environments.* Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 199-209, (1998).
24. Marino G., Maier, C., and Cundell, A.M. *A comparison of the MicroCount Digital System to plate count and membrane filtration methods for the enumeration of microorganisms in water for pharmaceutical purposes.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 54: 172-192, (2000).
25. Ignar, R., English, D., and Jimenez, L. *Rapid detection of microbial contamination in Triclosan and High Fluoride dentifrices using an ATP bioluminescence assay.* Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 6: 51-58, (1998).
26. Jimenez, L. *Adenosine Triphosphate bioluminescence analysis for rapid screening of microbial contamination in non-sterile pharmaceutical samples.* PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 58:159-168, (2004).
27. Gray, J.C., Morandell D., Gapp, G., Le Goff, N., Neuhaus, G., Staerk, A. *Identification of microorganisms after Milliflex rapid detection-A possibility to identify nonsterile findings in the Milliflex rapid sterility test.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 65, 42-54, (2011).
28. Gray, J.C., Staerk, A., Berchtold, M., Hecker, W., Neuhaus, G., Wirth, A. *Growth-promoting properties of different solid nutrient media evaluated with stressed and unstressed microorganisms: prestudy for the validation of a rapid sterility test.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 64, 249-263, (2010).
29. Reynolds, D.T., and Fricker, C.R. *Application of lasers scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples.* J. Appl. Microbiol. 86: 785-796, (1999).
30. Wallner, G., Tillmann, D., and Haberer, K. *Evaluation of the ChemScan system for rapid microbiological analysis of pharmaceutical water.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 53: 70-74, (1999).
31. Gapp G, Guoyard, S., Nabet, P., and Scouvard, J. *Evaluation of the applications of a system for real-time microbial analysis of pharmaceutical water systems.* European Journal of Parenteral Sciences 4: 131-136, (1999).
32. Costanzo, S.P., Borazjani, R.N., and McCormick, P.J. *Validation of the Scan RDI for routine microbiological analysis of process water.* PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 56: 206-219, (2002).
33. Ramond B, Rolland, X., Planchez, C., Cornet, P., Antoni, C., and Drocourt, J.L. *Enumeration of total viable microorganisms in an antibiotic raw material using ChemScan solid phase cytometer.* PDA J. Pharm. Sci. Technol. 54: 320-331, (2000).

34. Onadipe, A., and Ulvedal, K. *A method for the rapid detection of microbial contaminants in animal cell culture processes*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 55:337-345, (2001).
35. Smith, R., Von Tress, M., Tubb, C., Vanhaecke, E. *Evaluation of the ScanRDI as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method: comparison of the limits of detection*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 64, 356-363, (2010).
36. Connolly, P., Bloomfield, S.F., and Denyer, S.P. *The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics*. J. Appl. Bacteriol. 76: 68-74, (1994).
37. Connolly, P., Bloomfield, S.F., and Denyer, S.P. *A study of the use of rapid methods for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetics*. J. Appl. Bacteriol. 75: 456-462, (1993).
38. Kielpinski, G., Prinzi, S., Duguid, J., Du Moulin, G. *Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release for Carticel, autologous cultured chondrocytes*. Cytotherapy 7, 531-541, (2005).
39. Jimenez, L., Smalls, S., and Ignar, R. *Use of PCR analysis for rapid detection of low levels of bacterial and mold contamination in pharmaceutical samples*. Journal of Microbiological Methods 41: 259-265, (2000).
40. Jimenez, L. *Molecular applications to pharmaceutical processes and clean room environments*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 65:000-000, (2011).
41. Jimenez, L., and Smalls, S. *Molecular detection of Burkholderia cepacia in toiletries, cosmetic and pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of AOAC International 83: 963-966, (2000).
42. Jimenez, L., Bosko, Y., Smalls, S., Ignar, R., and English, D. *Molecular detection of Aspergillus niger contamination in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 49-56, (1999).
43. Jimenez, L., Ignar, R., D'Aiello, R., and Grech, P. *Use of PCR analysis for sterility testing in pharmaceutical environments*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 8: 11-20, (2000).
44. Jimenez, L., Smalls, S., Scalici, C., Bosko, Y., and Ignar, R. *PCR detection of Salmonella typhimurium in pharmaceutical raw materials and products contaminated with a mixed bacterial culture using the BAX™ system*. PDA Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology 55: 286-289, (2001).
45. Karanam V.R., Reddy, H.P., Subba Raju, B.V., Rao, J.C., Kavikishore, P.B., Vijayalakshmi, M. *Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1007-1018, (2008).
46. Farajnia, S., Hassan, M., Hallaj Nezhadi, S., Mohammednejad, L., Milani, M., Lotfipour, F. *Determination of indicator bacteria in pharmaceutical samples by multiplex PCR*. J. Rapid Methods in Automation in Microbiology 17, 328-338, (2009).
47. Skof, A., Poljak, M., Krbavcic. *Real-time polymerase chain reaction for detection of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in pharmaceutical products for topical use*. Journal of Rapid Methods and Automomation in Microbiology 12, 169-183, (2004).
48. La Duc, M.T., dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., Venkateswaran, K. *Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2600-2611, (2007).
49. Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., and Raoult, D. *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J. Clin. Microbiol. 38:3623-3630, (2000).
50. La Duc, M.T., Osman, S., Vaishampayan, P., Piceno, I., Andersen, G., Venkateswaran, K. *Comprehensive census of bacteria in clean rooms by using DNA microarray and cloning methods*. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6559-6567, (2009).

51. Probst, A., Vaishampayan, P., Osman, S., Moissl, C., Andersen, G., Venkateswaran, K. *Diversity of anaerobic microbes in spacecraft assembly clean rooms*. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2837-2845, (2010).
52. Eggers, M., and Ehrlich, D. *A review of microfabricated devices for gene-based diagnostics*. Hematologic Pathology 1995; 9:1-15.
53. Streefalnd, M., van de Waterbeemd, B., Happe, H., van der Pol, L.A., Beuvery, E.C., Tramper, J., Martens, D.E. *PAT for vaccines: The first stage of PAT implementation for development of a well-defined whole-cell vaccine against whooping cough disease*. Vaccine 25, 2994-3000, (2007).
54. English, D., Scalici, C., Hamilton, J., and Jimenez, L. *Evaluation of the TECRA™ visual immunoassay for detecting Staphylococcus aureus in cosmetic/pharmaceutical raw materials and finished products*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 7: 193-203, (1999).
55. Hughes, D., Dailianis, A., and Hill, L. *An immunoassay method for rapid detection of Staphylococcus aureus in cosmetics, pharmaceutical products, and raw materials*. Journal of AOAC International 82: 1171-1174, (1999).
56. London, R., J. Schwedock, A. Sage, H. Valley, J. Meadows, M. Waddington, D. Straus. *An Automated System for Rapid Non-Destructive Enumeration of Growing Microbes*. Plos One 5:1-16, (2010).
57. Miller M.J., Lindsay, H., Valverde-Ventura, R., O'Conner, M.J. *Evaluation of the BioVigilant IMD-A, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part I. Review of the technology and comparative studies with conventional methods*. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 63, 245-58, (2009).
58. Jimenez, L., Rana, N., Travers, K., Tolomanoska, V., Walker, K. *Evaluation of the Endosafe® Portable Testing System™ for the Rapid Analysis of Biopharmaceutical Samples*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 64, 211-221, (2010).
59. Gee, A.P., Sumstad, D., Stanson, J., Watson, P., Proctor, J., Kadidlo, D., Koch, E., Sprague, J., Wood, D., Styers, D., McKenna, D., Gallelli, J., Griffin, D., Read, E.J., Parish, B., Lindblad, R. *A multicenter comparison study between the Endosafe® PTS™ rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products*. Cytotherapy. 10,427-35, (2008).

Sección V. Aseguramiento de la calidad y Seguridad en el laboratorio de Microbiología.

	página
Capítulo V.1. Investigación de las Desviaciones de los Resultados Microbiológicos Mónica Lagomarsino	449
Capítulo V.2. Evaluación del Riesgo de Contaminación Microbiológica Mónica Lagomarsino	461
Capítulo V.3. Documentación y Registro Patricia Domínguez	470
Capítulo V.4. Incertidumbre de medición asociada a los resultados de ensayos microbiológicos Susana Carnevali	476
Capítulo V.5. Capacitación y Entrenamiento Patricia Domínguez	495
Capítulo V.6. Auditoría del Laboratorio de Microbiología Néstor Oscar Aversa	502
Capítulo V.7. Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología María Rosa Marelló	514

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 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 del juicio fue que se dio 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 especificaciones o de los criterios de aceptación preestablecidos. En dicha guía la única mención a los resultados microbiológicos se hacía 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 los resultados de análisis químicos: los ensayos microbiológicos y otras valoraciones biológicas fueron expresamente excluidos. Sin embargo muchos laboratorios y auditores aplican los conceptos de la guía 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 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 los países de habla hispana

como RFE. No hay aún una denominación en uso aún para los microbiológicos, por eso en adelante nos referiremos a estos resultados fuera de límites como *Desviación de los Resultados Microbiológicos* (DRM).

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⁾.

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 de Recuento Combinado de Hongos Filamentosos y Levaduras que 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 considerados “indicadores”.
- Detección de Microorganismos objetables, cuya ausencia no está explícitamente indicada en farmacopeas, pero que sin embargo deben estar ausentes por la naturaleza del producto, o por la vía de administración del medicamento, o por el tipo de pacientes a quienes está destinado, o por sus condiciones de salud.
- 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.
- Excursiones o resultados OOT de 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 con desarrollo microbiano.

De acuerdo a 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 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, que puede ser mayor que un límite que previamente debería ser establecido,
- la ausencia en muchos casos de controles positivos, o
- 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 ensayo.

Objetivos de la investigación

El objetivo de la investigación es determinar la “causa raíz” de la DRM. La investigación debe ser realizada aunque 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 su repetición. Además se debe determinar si el resultado está asociado a otros lotes del mismo producto o a otros productos.

La investigación de una DRM 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 DRM, y como consecuencia de ello, menor costo por resiembras y remuestreos, o por rechazo de materiales, y además menor tiempo por 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 a la armonización entre las farmacopeas de Estados Unidos de Norteamérica (USP), de los países de la Unión Europea (Eur. Ph) y de Japón (JP), se estableció un criterio de aceptación 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⁾

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

- su inherente variabilidad biológica,
- pueden estar dispuestos aislados, o en pares, o tetradas, o cadenas, o racimos, u otros, pero por los métodos tradicionales de recuento en placa forman una única colonia o unidad formadora de colonia (UFC),
- 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 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 una DRM, y sólo concluida ésta, y con ayuda del 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, puede ser 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 DRM 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 antiácidos.

Procedimiento general de una investigación

La investigación de una DRM debe estar previamente detallada en un Procedimiento Operativo Estándar (POE ó SOP), y debe ser documentada formalmente. Primeramente se realiza la investigación en el laboratorio, y luego, si no se encuentra la causa la investigación se continúa fuera del laboratorio.

INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA:

Una DRM puede ocurrir por un error en el laboratorio, o por las condiciones del ensayo o del laboratorio, o porque la contaminación supera los límites establecidos o por presencia de microorganismos específicos u objetables. En todos esos casos 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, 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 o farmacopeicos, los resultados pueden tardar 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 determinado 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 tradicionales son extremadamente dependientes del operador. El analista debe ser entrenado para que sepa los potenciales problemas que pueden ocurrir durante el análisis, y qué 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 detecta un error y continúa el análisis “a riesgo”, los resultados serán 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,
- 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 una DRM. Los microbiólogos con responsabilidad de supervisión deben tener un nivel apropiado de educación académica, y para investigar las DRM 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:

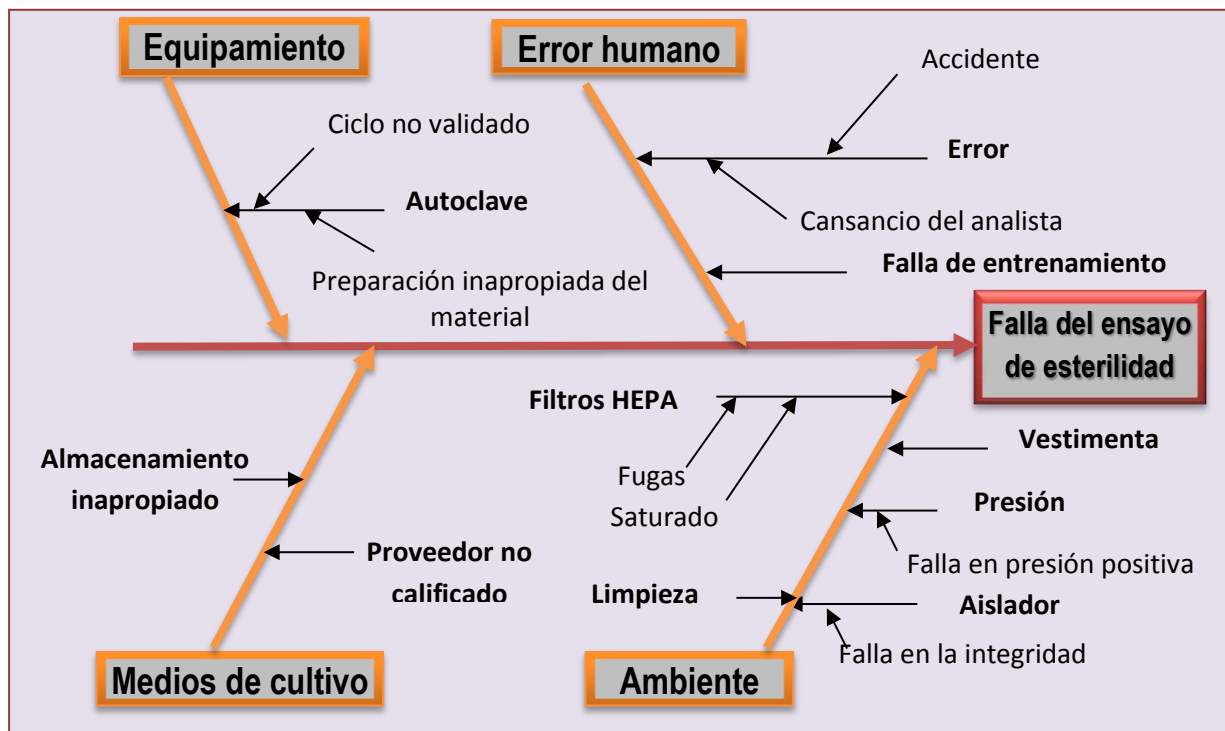
- Discutir con el analista el método que empleó, y confirmar que éste sabe efectuar correctamente el ensayo. Puede ser necesario una verificación visual de la forma de manipuleo aséptico o la forma de vestirse para ingresar al área de control, sobre todo si el contaminante es de origen ambiental o si 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, los controles negativos y los resultados de 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 DRM 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 una DRM 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 preventivas, el resultado debe invalidarse, y cuando sea posible 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 de la DRM 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 preventivas necesarias para evitar la repetición del resultado. Toda la investigación debe ser adecuadamente documentada. Puede ser necesario investigar en lotes anteriores del mismo producto o de otros. Toda acción tomada debe ser descrita en el documento, y si el resultado fuera del límite 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: El 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 la DRM fue 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 la DRM 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 la desviación

- Si se realiza un reanálisis de un recuento, puede ser necesario realizar más diluciones que permitan hacer un recuento 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 (aw), de la presencia de sustancias que inhiben el desarrollo microbiano, o de las condiciones de almacenamiento.
4. Remuestreo: El remuestreo puede ser realizado cuando hay sospechas sobre el procedimiento de muestreo, en ese caso el muestreo 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 y 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 quedaron 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 de la DRM 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 Garantía de Calidad.

Un ejemplo

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

Reporte: Desviación de los Resultados Microbiológicos (DRM)

Fecha: 10/08/09	Analista: PT	DRM
Producto: Mezcla para comprimir XX	Lotes: 18790-18791-18792-18793	# MI020

Descripción del DRM: El recuento de hongos no cumple especificación (Especificación: NMD 10² UFC/g)

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

Resultado de la identificación microbiana: *Aspergillus* sp

INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO:

Investigación preliminar - Cuestionario

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 al procedimiento vigente?	Sí
El analista estaba entrenado para efectuar el ensayo?	Sí
Ocurrió este DRM en el pasado? Si es SI aclarar el número de reporte? Reporte N°: N/A	No

Analista: PT	Fecha 10/08/09	Supervisor: SI	Fecha: 10/08/09

Reanálisis:

Las muestras para el reanálisis fueron tomadas en paralelo con las muestras del análisis original. El muestreo se justificó porque el número de UFC por placa es menos de 30 excepto en el último lote, y el motivo de este análisis es conseguir un resultado más preciso.

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

NOTAS:

- Sólo los lotes 18791 y 18792 fueron muestreados y analizados el mismo día.
- 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.

Estas observaciones demuestran que el muestreo y el análisis no son la causa de la DRM.

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 14/08/09

Gcia. de G. de Calidad: NX Date: 14/08/09

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 y cumplían con todos los requerimientos microbiológicos.
- El agua purificada fue analizada y cumplía con los requerimientos microbiológicos.
- 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 fue analizada 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.
- Durante la campaña solo se efectuaban limpiezas menores en algunas partes de los equipo.
- Según el SOP la limpieza profunda se realiza los fines de semana pero no especifica qué se hace los días feriados.

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 en ambos equipos. En los equipos que habían sido limpiados no se halló presencia de hongos.

Conclusión:

Las fechas de elaboración y los recuentos obtenidos sugieren que:

- El primer lote tenía 100 UFC/g.
- Como los equipos no fueron lavados y el granulado que quedó remanente en la granuladora y molino eran húmedos los hongos pudieron desarrollar en los siguientes 2 días hasta que el segundo lote fue elaborado, por lo que éste lote tuvo mayor recuento que el primero.
- El recuento permaneció en el mismo orden o se incrementó levemente en los lotes siguientes.

La DRM 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

Conclusiones

Una DRM inicial no necesariamente significa que el producto será rechazado.

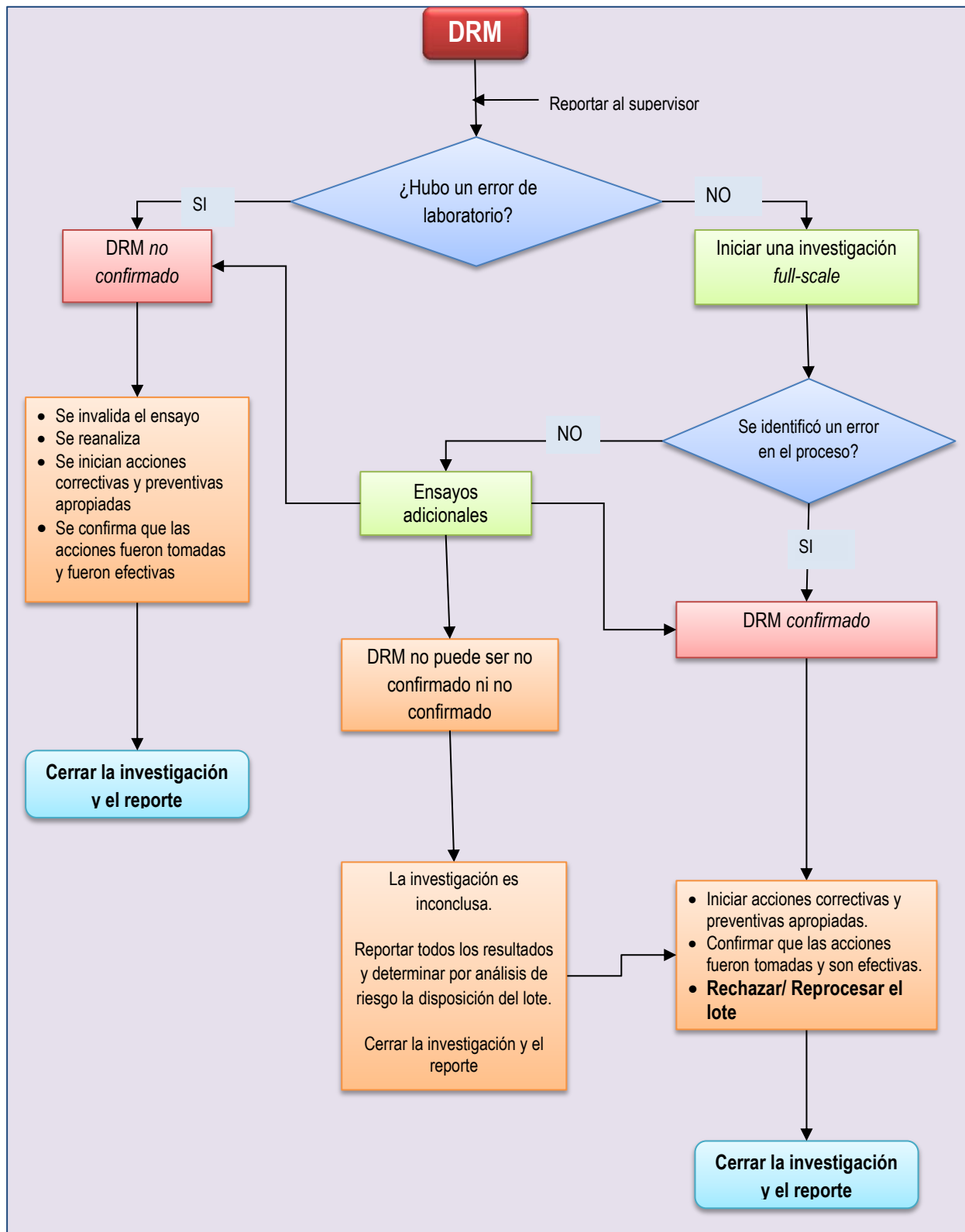
Una DRM *no confirmada* significa que el test debe ser invalidado por un error o problema en el laboratorio, en ese caso se debe establecer un plan de acción para corregir el problema y prevenir su repetición. Una vez que el plan ha sido cumplido debe verificarse su eficacia.

Una DRM *confirmada* 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 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.

Figura 2. 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 Laboratories*. 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> *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use*

Bibliografía 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 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.

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.

1. Identificación del riesgo:

Varios son los motivos que pueden ocasionar riesgo de contaminación microbiológica. A continuación se mencionan las maneras más comunes de identificarlos:

1.a. Por el tipo de producto: 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 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. Cuando no se puede 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 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).

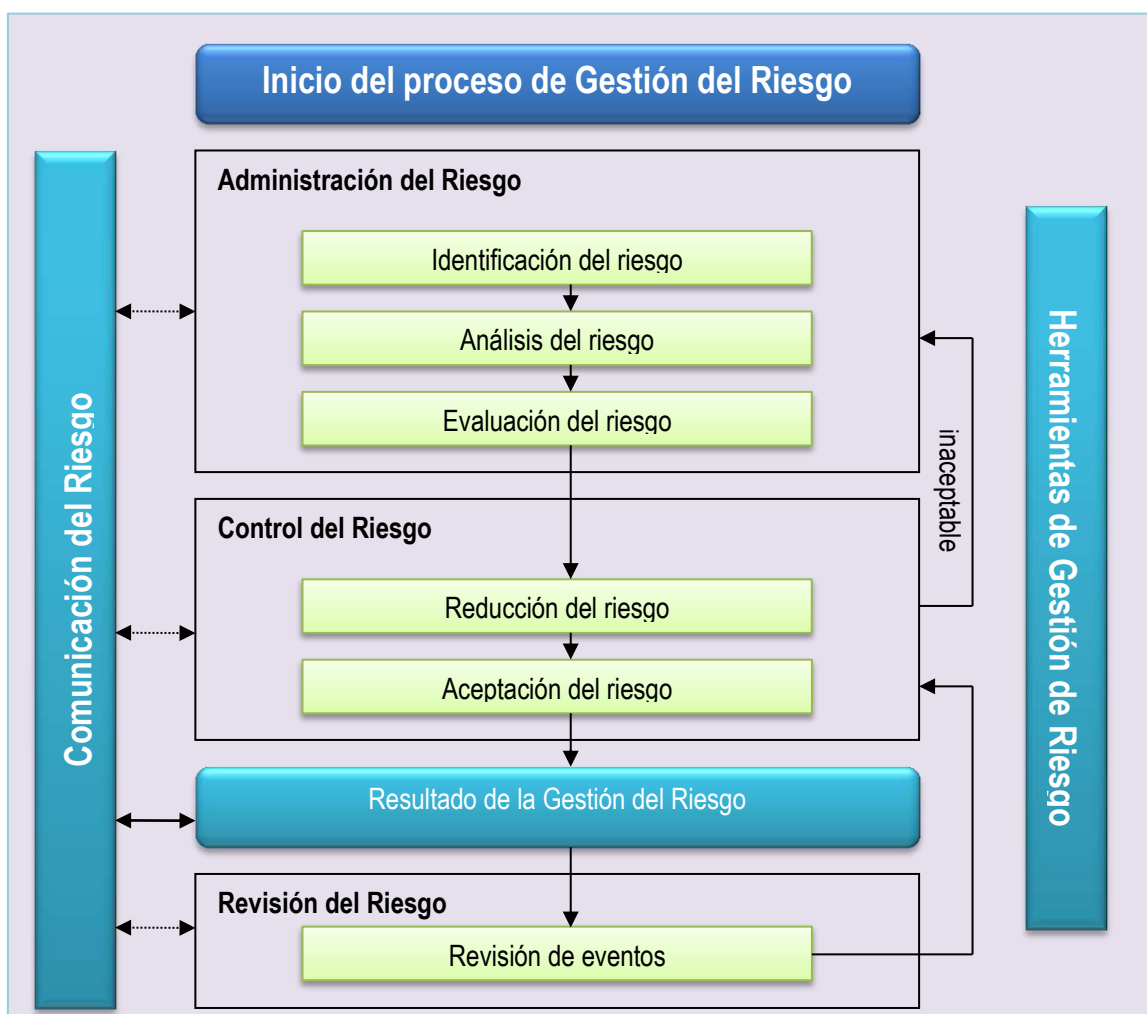


Figura 1: El proceso de gestión del riesgo – ICH Q9

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), el origen de los microorganismos aislados de productos no estériles en orden descendiente provienen de:

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

- (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. 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 tener contaminación. En este caso la contaminación depende sobre todo de las etapas finales de la purificación. Sobre todo el riesgo es mayor si se utiliza agua para efectuar la purificación o el lavado final.
- (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 la cubierta acuosa; 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 adecuadamente 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 depender de los procesos que se efectúan en dicha área. Los límites microbiológicos de los monitoreos ambientales deben ser establecidos de acuerdo a 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.
 - (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 no es 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 ^(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 entre ello y 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 analizar menos lotes del producto.

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.

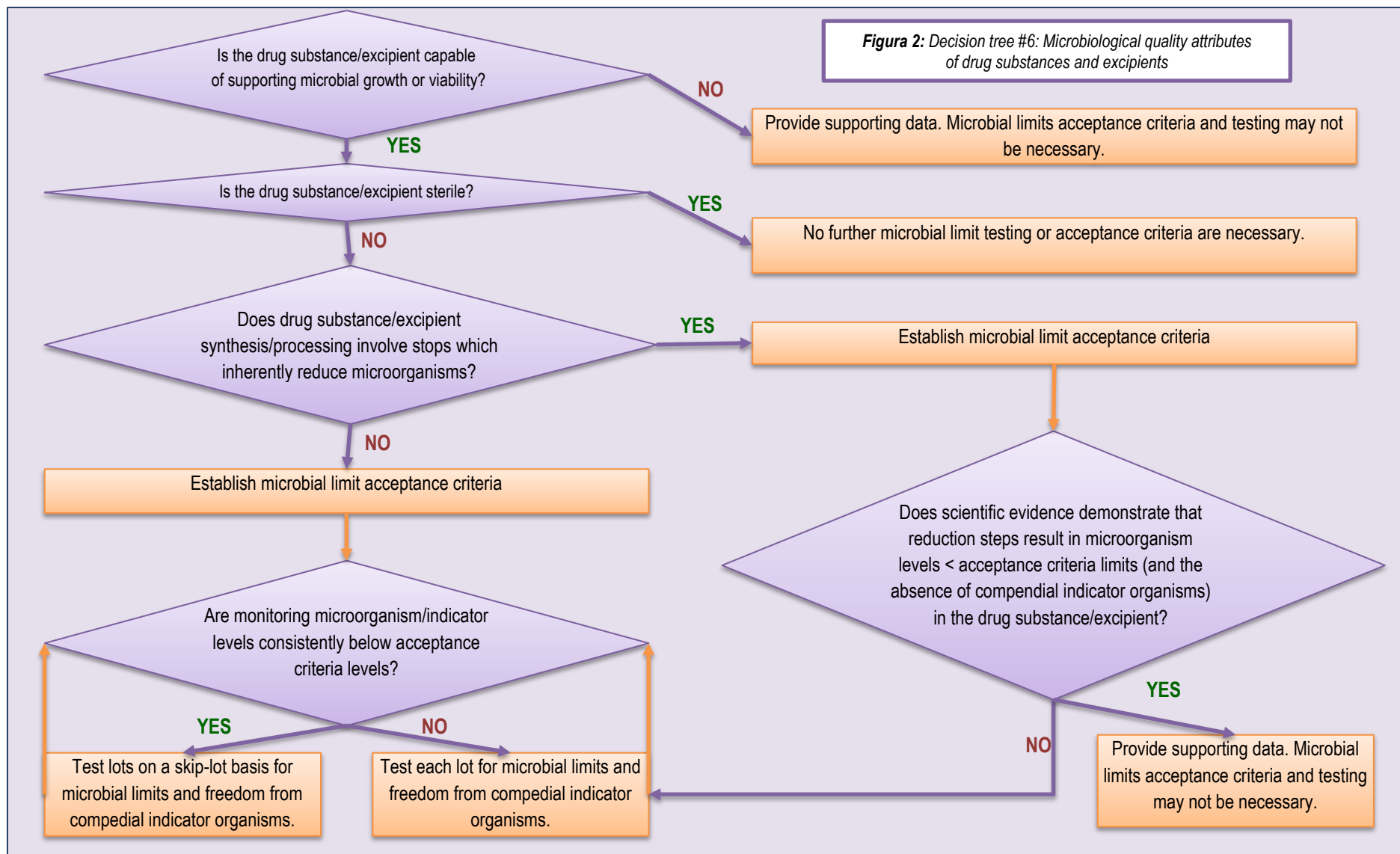
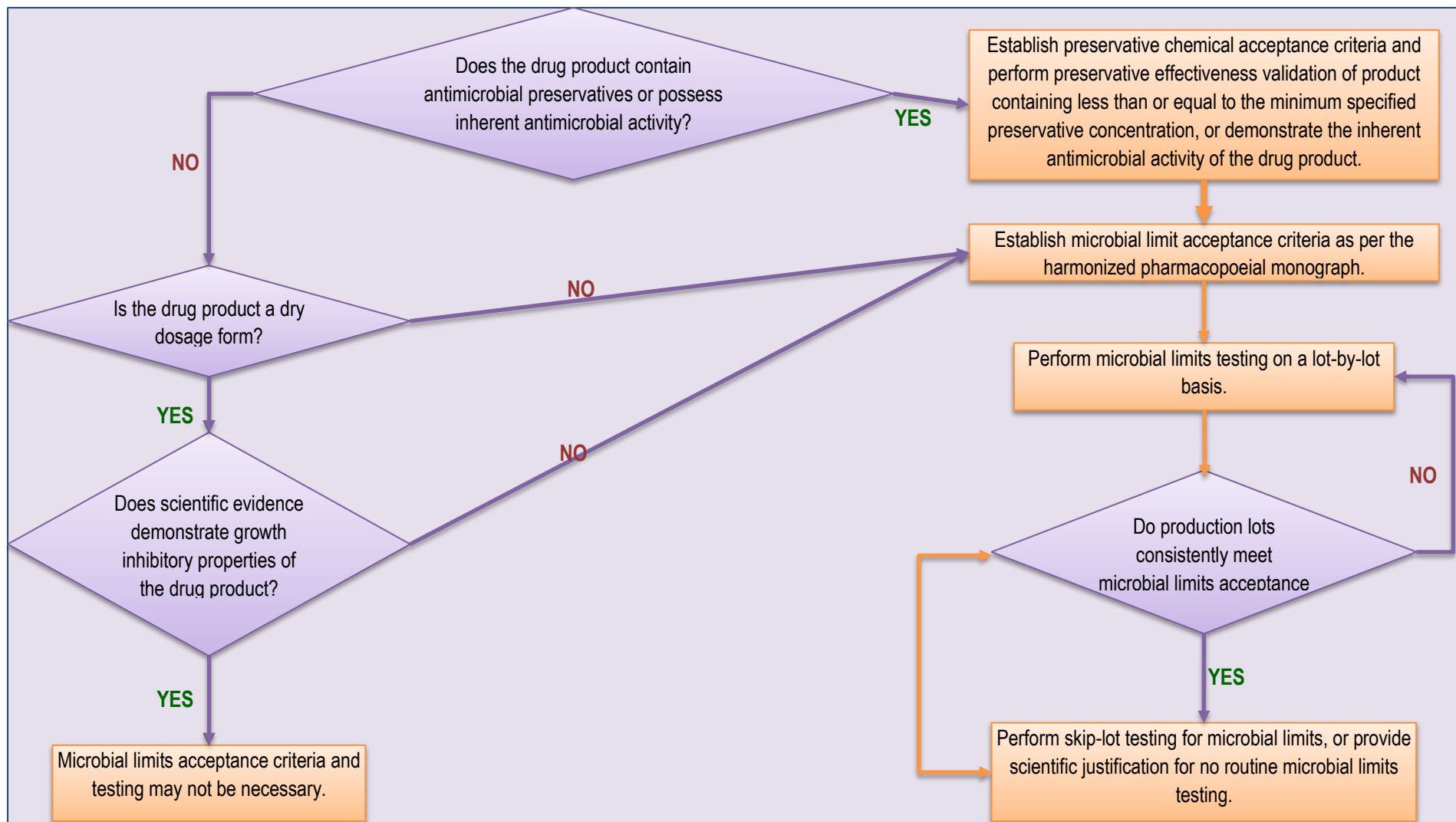


Figura 3: Decision tree #8: Microbiological attributes of non-sterile drug products



Referencias

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 N° 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 Approach 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 colaboradores actuales y ex- colaboradores y compañeros que me han apoyado. Y fundamentalmente a mi familia, que constantemente me han alentado en el proyecto de este manual.

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 podemos dividirlos 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 administrados 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 Bioindicadores.
 - 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 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 tenemos:

- 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 correspondientes firmas 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 transcritos.
 - Las correcciones también deben ser reverificadas.
- Si se usa un cuaderno deberá estar 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 realizado por personas autorizadas.
- Las firmas manuscritas no pueden ser reemplazadas por un sello.
- Las impresiones de los instrumentos deben estar incluidas a 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 archivar 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 posterior 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 es 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 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.

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 solo son posibles cuando se cuenta con las herramientas informáticas necesarias, capacitación permanente y por sobretodo 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. *Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/ Exportadores de Medicamentos* ANMAT (2004)

Incertidumbre de medición asociada a los resultados de ensayos microbiológicos

Susana Carnevali

1. *Introducción*
2. *Variabilidad de las mediciones microbiológicas y sus fuentes.*
3. *Características de los resultados de los ensayos: exactitud (precisión, veracidad) y su expresión cuantitativa.*
4. *Enfoques en la estimación de la incertidumbre de medición de los ensayos cuantitativos.*
5. *Estimación de la incertidumbre de medición en otros métodos de ensayo.*
6. *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 magnitud que se desea 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 analito¹, por ejemplo en un ensayo de enumeración de aerobios totales, será el número de ufc por la unidad de cantidad de muestra (ufc /ml ó 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 (o un múltiplo de ella), o la mitad de un intervalo de un nivel de confianza determinado (1).

¹ **Analito:** componente medido por el método de análisis. Puede ser el microorganismo (2), sus componentes o productos asociados (enzimas o toxinas) (3, 4).

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 estos 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. ⁽⁵⁾ 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 ^(5, 6, 7), como se muestra en la Figura 1, son:

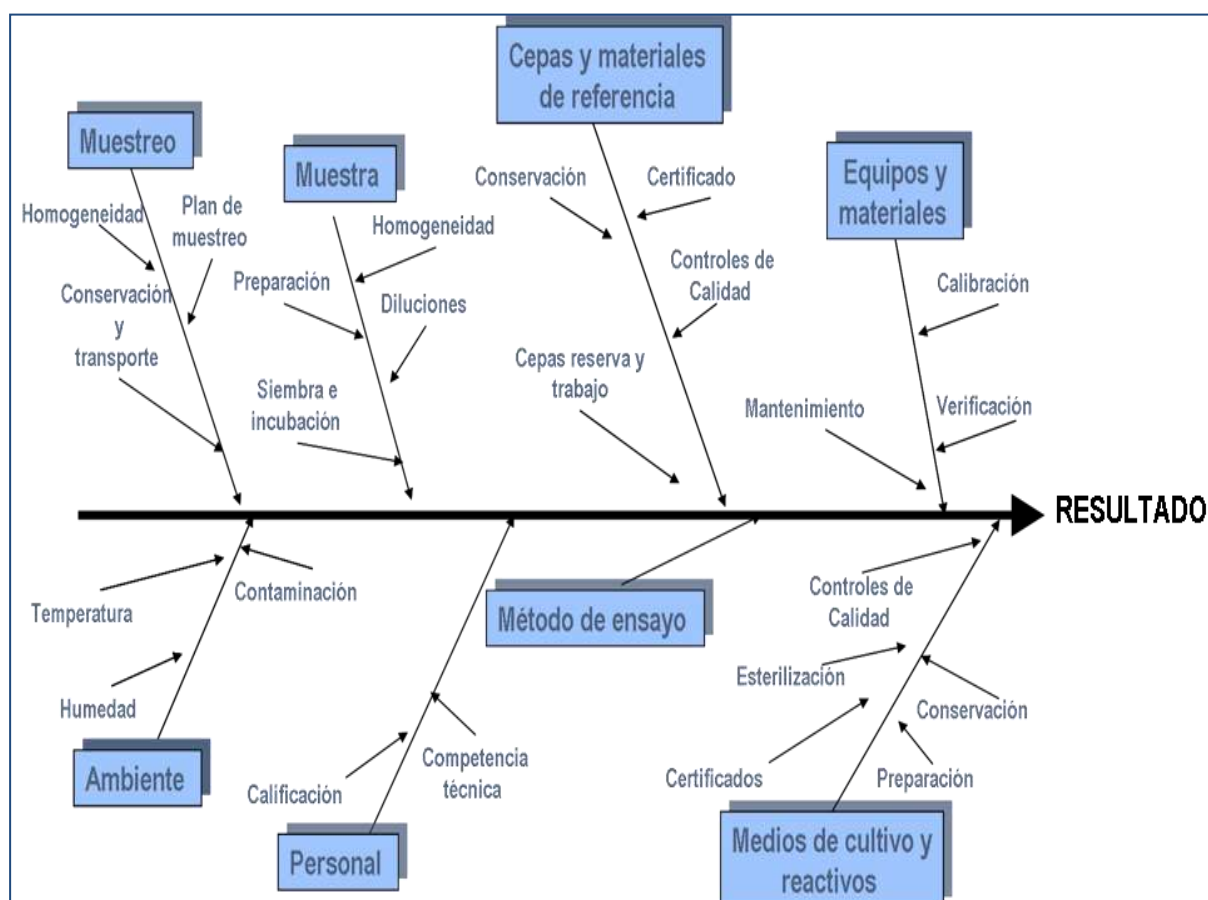


Figura 1 - Fuentes de incertidumbre

➤ Muestreo: naturaleza y homogeneidad de la muestra original; concentración y calidad de flora acompañante; tiempo, transporte y condiciones de almacenamiento entre muestreo y ensayo; 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 1° 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 alimento. Allí donde el alimento no ejerza alguna protección, la composición del diluyente adquiere importancia para prevenir o minimizar los posibles daños que puedan recaer en los microorganismos como consecuencia de rápidos cambios en la concentración iónica. 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 ⁽⁸⁾.
- 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; 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. Estos 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 (9) pueden estar asociados, entre otros, a la distribución de los microorganismos en la muestra original y en la porción analítica, 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 veracidad² y precisión³. La veracidad se expresa habitualmente

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.

en términos de sesgo o bias y la precisión se expresa numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas. Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad⁴, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad⁵. 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 cuándo 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.

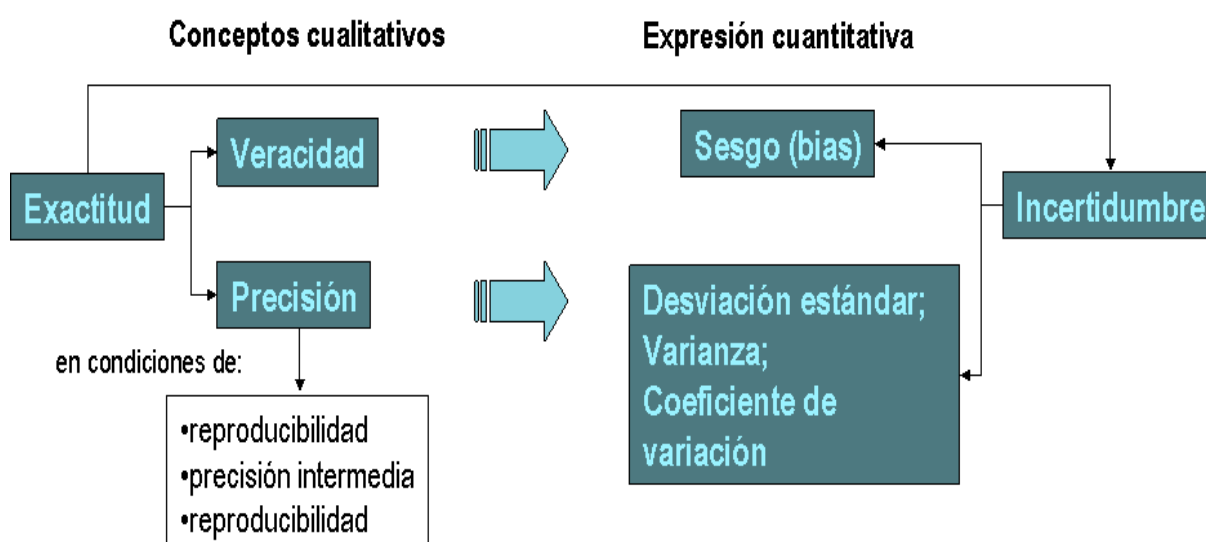


Figura 2 - Conceptos de precisión, veracidad y exactitud y su expresión cuantitativa.

Con respecto al sesgo, dada la naturaleza empírica⁶ 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

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).

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 (10). Un método de

utilizados, entre otros, el que determina directamente el resultado de la medición, por ejemplo, el número de 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.

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 ⁽¹¹⁾, 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. ⁽⁵⁾, 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 ⁽¹²⁾. 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 ISO⁷ en 1993 y en otras publicaciones, tales como la guía EURACHEM / CITAC para química analítica ⁽¹³⁾. 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 ⁽¹⁴⁾, 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” ⁽¹⁵⁾, 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 ⁽¹⁶⁾ 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 ⁽¹⁷⁾ y que se calcula a través de la siguiente fórmula:

ensayo diferente (a menudo para el mismo analito) puede dar un resultado diferente, dado que el mensurando se define en los términos del método.

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

$\sum (y_{i1} - y_{i2})^2$ 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 (21, 22).

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 (6, 7, 16, 18, 19, 20, 21).

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.

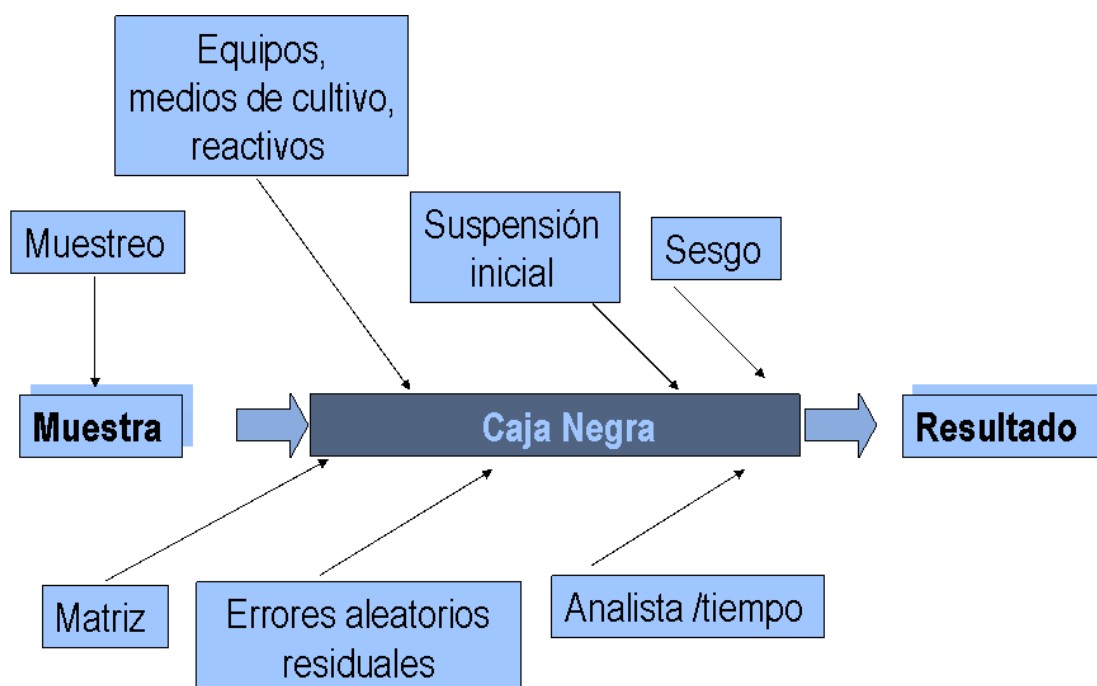


Figura 3 - Diagrama de la Caja Negra (Fuente: ISO/TS 19036:2006)

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 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 ^(14, 23). 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 ^(7, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31).

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 la 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 especifica los cálculos y recomienda su uso y posteriormente las ventajas e inconvenientes de utilizar las otras dos.

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 ⁽²³⁾.

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.

¿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.

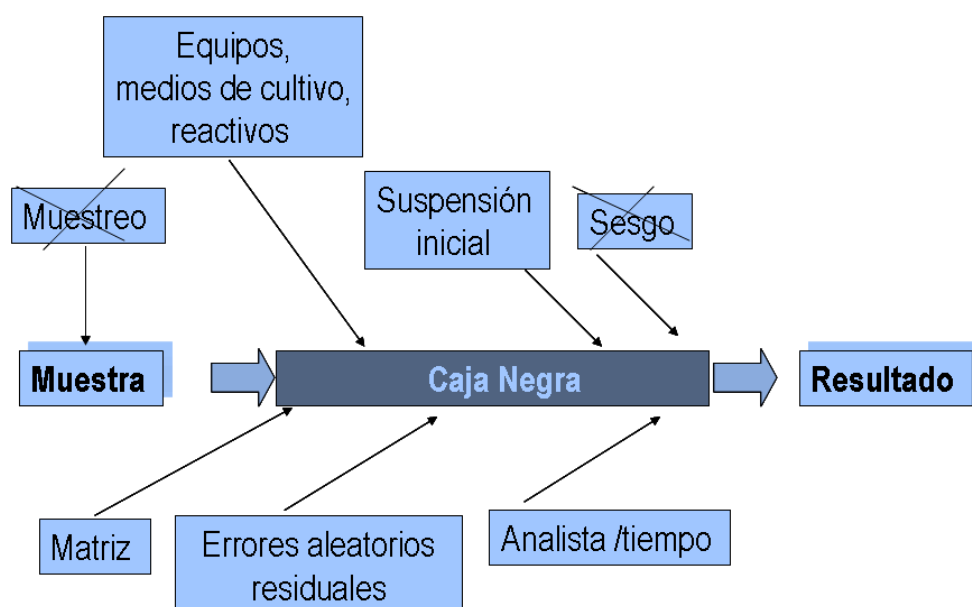


Figura 4 - Fuentes de incertidumbre cubiertas por la determinación experimental de la s_R intralaboratorio (Fuente: ISO/TS 19036:2006)

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 AFSSA⁹ (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 matrices¹⁰ 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.

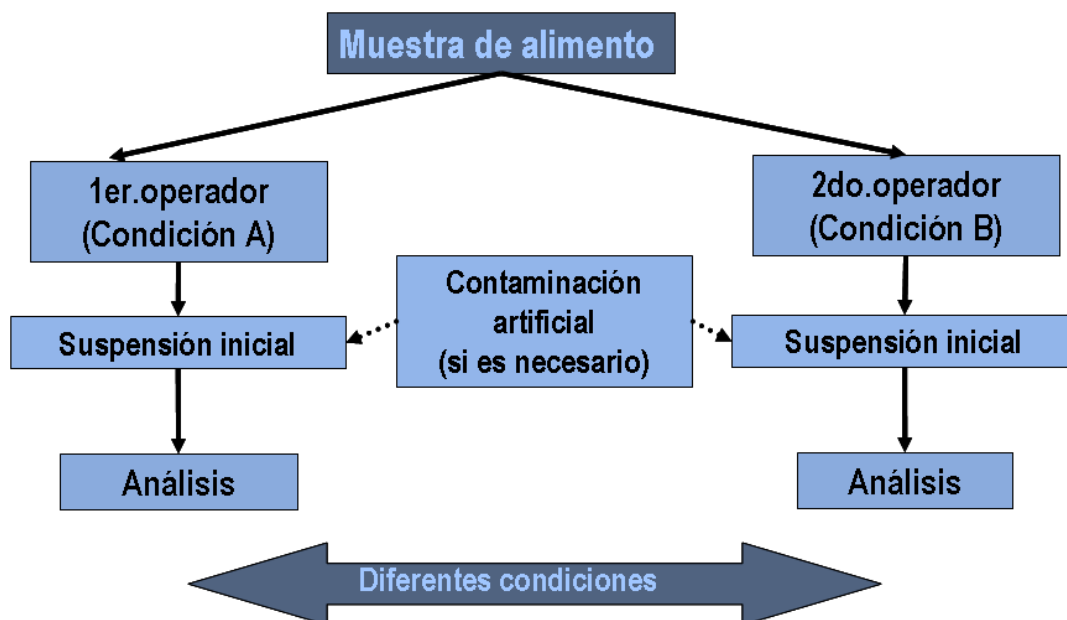


Figura 5 - Protocolo para la determinación experimental de la s_R intralaboratorio (Fuente: ISO/TS 19036:2006)

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 B de la norma ISO 16140(2).

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 $0,2 \log_{10} (\text{ufc} / \text{g})$ o $0,2 \log_{10} (\text{ufc} / \text{ml})$. 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 (23)

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 ($n \geq 10$)

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 el 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

$0,18861/\sum C$ es el componente de la varianza debida a la distribución de Poisson, en la cual la sumatoria de C ($\sum C$) 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, $CV=1/\sqrt{\sum C}$, 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 $(\log_{10}e)^2 = 0,18861 \times (CV)^2$

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

¹² **Incetidumbre 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 ⁽²³⁾.

distribución de Poisson es despreciable. En ese caso el cálculo de la incertidumbre expandida, se reduce a la siguiente fórmula:

$$U = 2s_R \quad (2)$$

Para tomar esta decisión, es decir 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) ó (2) es despreciable (<5%):

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

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 como 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, en un período de 5 meses, datos 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	Σ(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

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: $1100 \text{ ufc/g} = 1,1 \times 10^3 \text{ ufc/g}$

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

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

$$U = 2s_R = 0,30$$

El resultado podrá expresarse como:

$$1,1 \times 10^3 \text{ ufc/g} \quad [5,5 \times 10^2; 2,2 \times 10^3]$$

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: $110 \text{ ufc/g} = 1,1 \times 10^2 \text{ ufc/g}$

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

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

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

El resultado podrá expresarse como:

$$1,1 \times 10^2 \text{ ufc/g} \quad [4,9 \times 10^1; 2,4 \times 10^2]$$

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:

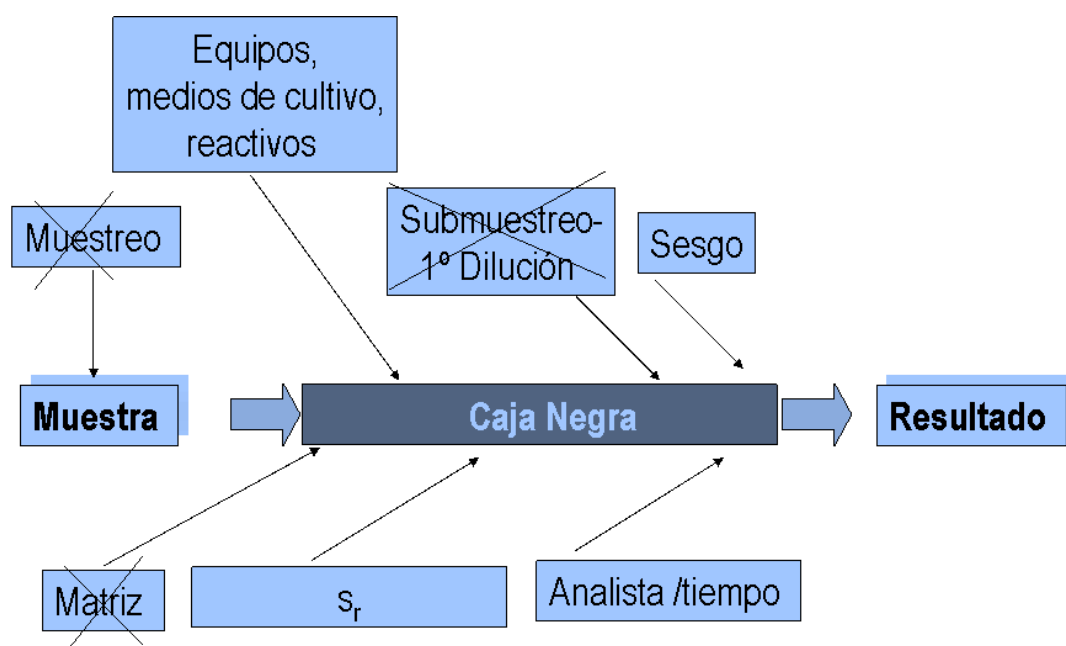


Figura 6 - Fuentes de incertidumbre cubiertas por estos protocolos (Fuente: ISO/TS 19036:2006)

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 ⁽³²⁾.

4.3 La Norma ISO 29201:2012

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 y el NMP. Este documento hace referencia a otras normas y guías, por ejemplo, Informe Nordtest TR 537^(16, 21), Procedimiento N° 8 NMKL⁽³¹⁾, ISO/TS 19036⁽²³⁾, ISO/TR 13843⁽²²⁾, BS 8496⁽³⁴⁾, ISO 8199⁽³⁵⁾ y a dos publicaciones de Forster ^(16, 21) de Nueva Zelanda y Niemelä ⁽¹²⁾ 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 naturales. 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.

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. 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.

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 ^(6, 20, 36), 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 e 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⁽¹⁶⁾.

La norma ISO 29201:2012⁽¹⁵⁾, 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.

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 LOD₅₀, 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-Kärber 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 ^(5, 9, 14, 37).

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 ⁽¹¹⁾ 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 ⁽⁵⁾.

Varios organismos de acreditación ^(6, 7, 20, 36) 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 Positivos¹³ y Tasa de Falsos Negativos¹⁴, 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 ⁽⁶⁾.

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 ^(15, 23).

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). *Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados* (VIM). JCGM 200:2008. JCGM 200:2008 Corrigendum. 2010
2. ISO 16140:2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
3. AOAC INTERNATIONAL. *Methods Committee Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis*. Journal of AOAC Int. Vol. 85, No 5, 2002.
4. NMKL/NordVal. *Protocol for the validation of alternative microbiological methods*. 2009.
5. 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.
6. Canadian Association for Laboratory Accreditation (CALA). P19 – CALA Measurement Uncertainty Policy Revision 1.10. 2010
7. Singapore Accreditation Council (SAC). Technical Guide2. *A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical & Microbiological Analysis*. Second Edition, 2008.
8. ICMSF. *Microorganismos de los Alimentos 7: Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. Ed. Acribia, 2004
9. Jarvis B. *Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods*. Academic Press; 2 ed., 2008.
10. AOAC INTERNATIONAL. Términos y definiciones. Disponible en: <http://www.aoac.org/accreditation/terms.htm>
11. ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*.
12. Niemelä, S.I *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Publication J4/2003. Centre for Metrology and Accreditation (MIKES), Helsinki, Finland. 2003
13. Ellison, S.L.R; Rosslein, M; Williams, A. EURACHEM/CITAC guide: *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 2nd ed. EURACHEM/CITAC, QUAM: 2000.1. 2000
14. Lombard, B. *Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach*. Accred Qual Assur., 17: 94–100, 2006.
15. 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.
16. Forster, L.I. *Measurement Uncertainty in Microbiology*. Journal AOAC. International. Vol 86.Nº5, 2003.
17. 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.
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. Forster, L.I. *Conclusions on Measurement Uncertainty in Microbiology*. Journal AOAC. International. Vol. 92, No. 1, 2009.

22. ISO/TR 13843:2000. Water quality -- *Guidance on validation of microbiological methods*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
23. 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.
24. Dutch Accreditation Council. Explanatory Document on Microbiology. RvA-T2. 2006.
25. Federal Agency for the Safety of the Food Chain – FASFC. *Microbiology – Estimating measurement uncertainty in microbiological testing*. LAB P 507. 2009
26. American Association for Laboratory Accreditation (A2LA).G108 - *Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods*. 1st ed., 2007.
27. Danish Ministry of the Environment. Environmental Protection Agency. *A guidance document on microbiological control of cosmetic products*. Environmental Project No. 1336, 2010
28. National Association of Testing Authorities, Australia (NATA). ISO/IEC 17025 *Biological Testing Field Application Document*. Supplementary requirements for accreditation. 2009
29. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). *Análisis microbiológicos*. Documento aclaratorio. NT-32 Rev. 2. 2010
30. Instituto Português de Acreditação. *Guia para a estimativa da incerteza em ensaios microbiológicos*. OGC005. 2006
31. Nordic Committee on Food Analysis (NMKL). *Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods*. Procedure No. 8, Version 4, 2008
32. ISO 21748:2010. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
33. 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.
34. 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*.
35. ISO 8199:2005. *Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*.
36. 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.
37. AOAC INTERNATIONAL *Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology*. BPMM Task Force Final Report. 2006.

Capacitación y Entrenamiento

Patricia Domínguez

- *Introducción*
- *Requerimientos*
- *Programa de Entrenamiento efectivo*
- *Implementación del Programa*
- *Conclusiones*
- *Referencias*

Introducción

La Capacitación y 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 cual 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 medios de cultivo y esteriliza
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

Especiales del Laboratorio de Microbiología

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

Otros Complementarios

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

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 autocritica 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:

Paso 1. 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 que la persona debe recibir esta capacitación.

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

Paso 4: Corresponde a la etapa de comprensión, como 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 formar parte del conocimiento del colaborador,
- la comprensión del tema que debe incluir la resolución de problemas por sí 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 del 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 capacitación 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 educativos 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*, 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, sobretudo 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*

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 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:

- Renovaciones de aire: Seleccionado por las necesidades más que por la "tradición". Se recomienda entre 6 a 20 renovaciones/hora, 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).
- Partículas generadas por el proceso y los operadores.
- Carga térmica, a los efectos de disponer de temperatura de confort y prevenir contaminación microbiana.
- 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 re-circulado 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.
- 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:
 - ✓ 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 $\Delta p=15\text{Pa}$ con un rango que puede oscilar entre 5 Pa y 20 Pa.

Figura 1. Sello tipo cascada.

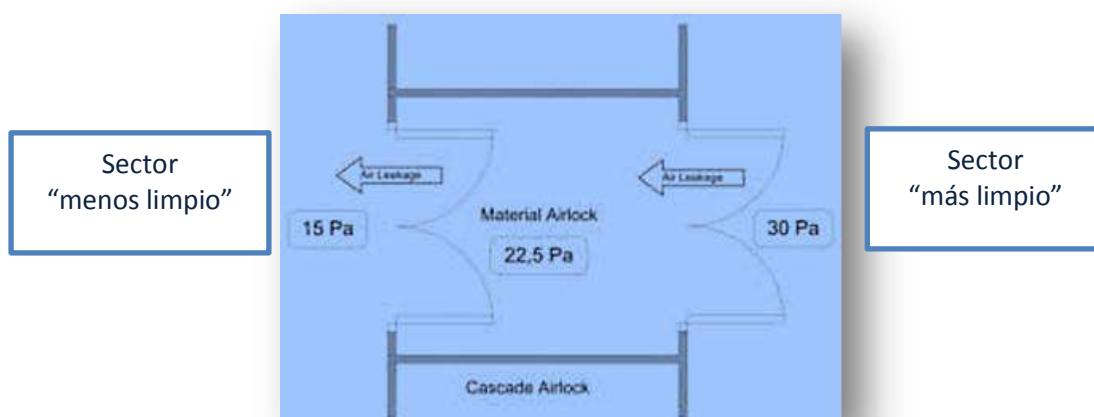


Figura 2. Sello tipo sumidero (Sink Airlock).

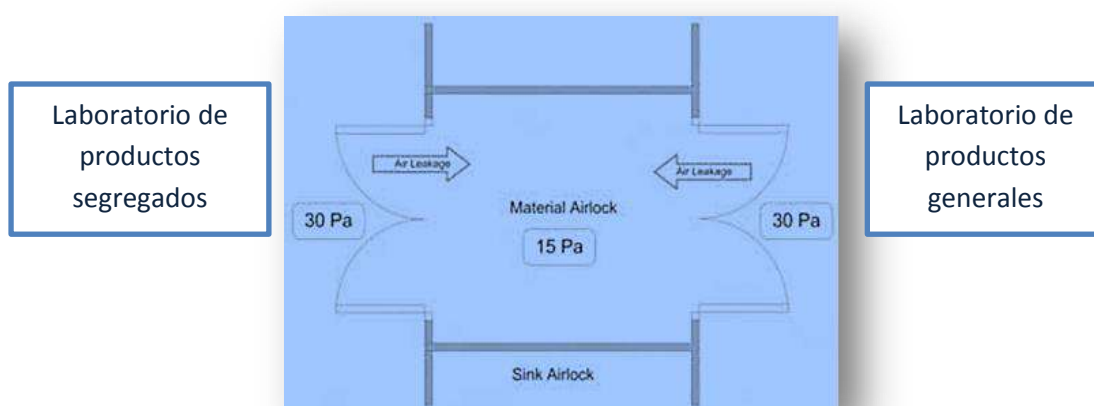
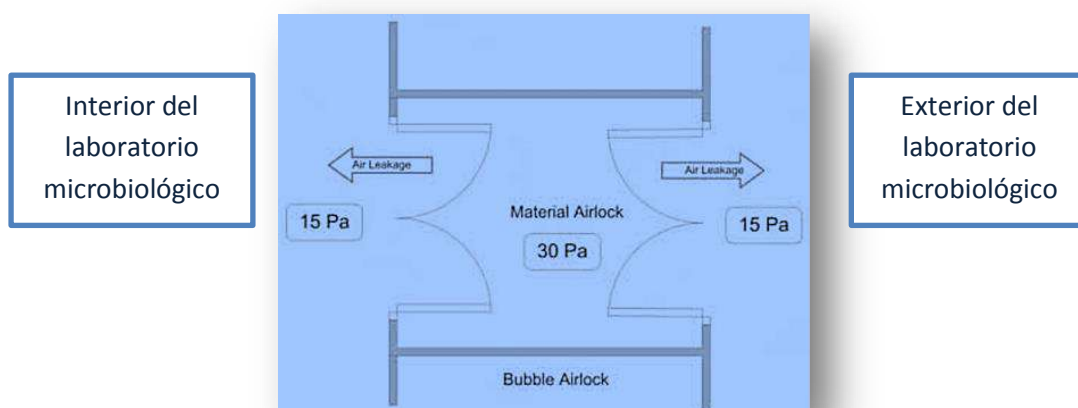


Figura 3. Sello tipo burbuja (Bubble Airlock).



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 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, UDAF en entorno no clasificado.
- Tanto clase A como B: Filtros HEPA terminales.
- 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 al habitáculo.
- Superficies suaves que eviten acumulación de partículas.
- Evitar drenajes.
- Evitar extremos muertos en cañerías.
- Instalaciones de lavado solo en la primera etapa de los vestuarios.
- Grado D-----Grado C-----Grado B (entorno del grado A)-----Grado A debe ser secuencial.
- Interlockeo 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.
- 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 dióxido de cloro como el ozono 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 para 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/m ³
Test de esterilidad Flujo laminar unidireccional (UDAF)	Grado A	ISO 5 (UDAF) y <1ufc/m ³
Test de esterilidad-alrededor del UDAF	Grado B	ISO 5(turbulento) y <10ufc/m ³
Test de esterilidad-aislador	Grado A (Partículas no viables y microbiología solamente)	ISO 5 (UDAF) y <1ufc/m ³
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.

Para el caso de **pHmetros** el auditor deberá verificar el control diario con 2 buffers, la limpieza de electrodos, el

reemplazo de la solución saturada de cloruro de potasio y la verificación del instrumento frente a puente de Wheastone.

Purificadores de agua: 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.

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 sanitización 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, estufas	Limpiar y desinfectar superficies internas	-Mensualmente -Cuando se requiera (3 meses) -Cuando se requiera (anual)
Baños de agua	Vaciar, limpiar, desinfectar y rellenar	Mensualmente o cada 6 meses si se usa biocida
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	-Cada uso -Anualmente
Destiladores	Limpiar y desincrustar	Según se requiera (3 meses)
Desionizadores, Ósmosis inversa	Reemplazar 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

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.
- **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.
- **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 debe figurar los 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. Como se evita la contaminación de ropa empleada en áreas limpias versus la empleada en áreas comunes del laboratorio, particularmente la empleada para tareas de cepario y tipificación.
- *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. Particular atención debe prestar al auditor para que por ejemplo personal encargado de muestreos no ingrese o trabaje en el área con microorganismos 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 microorganismos para lo que este procedimiento de limpieza debe hallarse validado del punto de vista de residuos químicos.
- *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 para lo que puede requerirse un electrodo de superficie para medios sólidos, lote del medio deshidratado, lote del medio preparado, cantidad de agua empleada, condiciones de almacenamiento y su vencimiento en base a estudios de validación.
 - 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 durante 15 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 y 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 sub-cultivo 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 / ml de medio de cultivo.
- *Control microbiológico de aguas*: Frecuencia, distribución de puntos de muestreo para agua potable, purificada y para inyectables si corresponde, métodos empleados (siembra en placa, filtración por membrana). Establecimiento de límites de alerta y acción. ⁽²⁰⁾.
- *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 hasta incluir criterios específicos para antiácidos, 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 re-test y en qué casos re-muestreo. 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 descritas 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 descritas 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, re-calificaciones, 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 re-evaluación 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. *Buenas 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. *Guidance 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: *Pascals*. 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} .

Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología

Maria Rosa Marello

- *Introducción*
- *Definiciones*
- *Higiene y protección individual*
- *Accidentes e incidentes*
- *Estimación del Riesgo biológico*
- *Niveles de Bioseguridad*
- *Agentes biológicos*
- *Comparación de la clasificación de los agentes biológicos según la Comunidad Europea y las Normas IRAM*
- *Conclusiones*
- *Bibliografía*

Introducción

La seguridad y en particular la seguridad biológica son temas 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.

Las normas de Seguridad Biológica intentan reducir a un mínimo aceptable el riesgo inherente a la manipulación de material biológico. Es importante conocer con que microorganismos se trabaja para el Grupo de Riesgo y, en consecuencia el Nivel de Bioseguridad, el cual condicionará las características edilicias que deben tener el laboratorio y la protección que se proporciona al operador, de tal manera que el mismo esté expuesto al mínimo peligro posible.

Además el personal del laboratorio de Microbiología se arriesga a accidentes (físicos, químicos) e incidentes para lo cual se debe considerar la protección del analista que manipula sustancias que pueden presentar problemas de salud y tomar las precauciones necesarias en salvaguarda de la misma

Es muy importante la formación y capacitación en las Normas de Bioseguridad para que los programas sean eficaces.

Definiciones

Bioseguridad (*biosafety*): conjunto de métodos tendientes a minimizar el riesgo asociado al manipuleo de microorganismos, mediante la protección de operadores, personas del entorno, animales y medio ambiente. Involucra técnicas de laboratorio, equipos de seguridad y diseño de las instalaciones ⁽¹⁾.

Biocustodia (*biosecurity*): describe la protección, control y responsabilidad de la institución sobre los materiales

biológicos a fin de prevenir su empleo no autorizado, pérdida, robo, uso indebido, desvío o liberación intencional⁽³⁾.

Agente biológico: microorganismos, incluyendo los que han sido genéticamente modificados, cultivos celulares y parásitos humanos, que son capaces de provocar infección, alergia o toxicidad. ⁽⁴⁾

Microorganismo: es una entidad microbiológica celular o no celular, con capacidad de replicación ó de transferir material genético⁽⁴⁾.

Cultivo celular: crecimiento *in vitro* de células derivadas de organismos multicelulares ⁽⁴⁾.

Viabilidad: habilidad del microorganismo para propagarse. ⁽¹⁾.

Virulencia: grado de patogenicidad de un microorganismo para producir enfermedad ⁽¹⁾.

Patogenicidad: capacidad de un agente infeccioso para causar daño a un hospedador ⁽¹⁾.

Vía de transmisión: mecanismo de penetración de un microorganismo al hospedador ⁽¹⁾.

Transmisibilidad: conjunto de mecanismos que permiten propagar una enfermedad.

Tipo de actividad: clasificación de las operaciones que se realizan con los agentes infectantes en el ambiente laboral ⁽¹⁾.

Endemicidad: propiedad de una enfermedad para permanecer en una región determinada ⁽¹⁾.

Contención: es la reducción de los agentes potencialmente peligrosos a fin de evitar la exposición del personal de laboratorio. Existen dos formas: primaria y secundaria ⁽⁵⁾.

Contención primaria: se aplica al cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y la correcta utilización de los equipos de seguridad (ropa adecuada, guantes, barbijos, cabinas de seguridad biológica)

Contención secundaria: se refiere a la protección del ambiente externo de los agentes infecciosos. Esto se logra con un correcto diseño de las instalaciones.

Higiene y protección individual

Independientemente del tipo de riesgo que posea el laboratorio, existen normas básicas de seguridad que se aplican en todos los casos:

- ♦ Acceso limitado al personal autorizado
- ♦ Empleo de las barreras de protección primaria adecuadas: guantes, bata de mangas largas, sin botones, gafas, máscaras, calzado cerrado.
- ♦ No usar la indumentaria de trabajo y/o los equipos de protección personal fuera de las áreas restringidas.
- ♦ No comer y no fumar en el laboratorio.
- ♦ No usar maquillaje.
- ♦ No pipetear con la boca.
- ♦ No oler directamente los reactivos y materiales.
- ♦ No tocar reactivos y materiales sin guantes.
- ♦ Adoptar procedimientos que impidan generación de aerosoles.
- ♦ Decontaminar las mesadas de trabajo antes y al finalizar las tareas de cada día y cada vez que se derrame material químico o biológico.
- ♦ Colocar los residuos en recipientes rotulados según el tipo del mismo, destinados a tal fin.
- ♦ Lavar manos con antisépticos antes de colocar los guantes y después de quitar los mismos previo al retiro del área.
- ♦ Almacenar muestras y reactivos en heladeras distintas.
- ♦ Colocar carteles indicadores de riesgo en lugares claramente visibles.
- ♦ Usar solamente agujas y jeringas ya montadas.

- ♦ Desechar agujas y jeringas sin desmontar en contenedores especiales diseñados a tal efecto.
- ♦ Comunicar a la supervisión, quien lo debe registrar, heridas y cortes que se hayan producido durante la realización de las tareas.
- ♦ Capacitar periódicamente a los operadores en los procedimientos operativos relacionados con los accidentes biológicos.
- ♦ Realizar un listado de los operadores expuestos a los microorganismos de los Grupos 3 y/o 4 indicando el tipo de tareas realizadas, con qué microorganismo trabajó, exposición al mismo, accidentes e incidentes.
- ♦ Mantener esta lista por lo menos 10 años a partir de la última exposición del operador ⁽⁴⁾.

Accidentes e incidentes

Los **accidentes** son acontecimientos anormales no deseados y que se presentan en forma inesperada y que causan lesiones a las personas o daños materiales.

Los **incidentes** son acontecimientos no deseados que se presentan en forma brusca y que pueden causar o no lesiones a las personas o daños materiales ⁽⁸⁾. Las causas de accidentes e incidentes pueden ser similares, la diferencia radica en las consecuencias. Evaluar correctamente un incidente es de gran utilidad para prevenir accidentes. Los tipos de riesgos que pueden ocasionar accidentes e incidentes pueden ser físicos, químicos y biológicos

Riesgo físico: está relacionado con los factores ambientales (ruido, iluminación, radiación, temperatura elevada, vibración) que pueden actuar sobre los tejidos y órganos del operador produciendo un efecto nocivo. Para minimizar este tipo de riesgo se debe conocer bien los materiales con los que se trabaja y tomar las precauciones convenientes.

Además el riesgo físico incluye al **riesgo eléctrico** y **de incendio**.

Para evitar el **riesgo eléctrico** se deben tomar una serie de precauciones:

- ♦ Conexión a tierra de los equipos
- ♦ Transformador de seguridad
- ♦ No tocar elementos eléctricos con las manos húmedas
- ♦ Evitar las conexiones caseras
- ♦ Controlar la integridad de fichas y cables antes de conectarlas

Para que exista fuego como tal con llama y por ende **Riesgo de incendio** es necesario que esté presente el tetraedro de fuego:

Material combustible - Oxígeno - Temperatura - Reacción en cadena

Según el material que arde, el fuego se clasifica en

- A: cuando arde material sólido
- B: cuando arde material líquido
- C: cuando arde material gaseoso
- D: cuando arden metales
- E: cuando arde material eléctrico

En el laboratorio se pueden producir los cinco tipos de fuego. La extinción se realiza mediante extintores que básicamente son:

- a) agua: actúa por enfriamiento
- b) espuma: indicados para líquidos, actúa por sofocación
- c) polvo seco: actúa por sofocación
- d) gas inerte (CO₂): actúa por sofocación y enfriamiento.

Riesgos químicos:

Se deben conocer las características peligrosas de los reactivos químicos para saber cómo trasladarlos, almacenarlos, manipularlos y descartarlos. Estas características incluyen: toxicidad, corrosividad, inflamabilidad, radiactividad.

Los accidentes químicos se pueden producir por inhalación (oler directamente del frasco, no usar campana), por deglución (pipetear con la boca), por contacto (salpicaduras con ácidos, álcalis sustancias tóxicas o cancerígenas)

Riesgo biológico

Peligro biológico: Es la propiedad inherente de un agente infeccioso o parte de él para causar un potencial efecto adverso sobre los seres humanos, animales o plantas. Puede ocurrir directamente a través de una infección o indirectamente por la disrupción en el medio ambiente.

Riesgo biológico: Probabilidad de que ante un determinado peligro se produzca un daño, pudiendo por ello cuantificarse.

Para evaluar el Riesgo biológico se deben considerar los siguientes factores: patogenicidad, vías de transmisión, transmisibilidad, virulencia, viabilidad, endemidad de los microorganismos con que se trabaja. Estas propiedades incluyen todos los organismos patógenos (bacterias, virus, hongos, parásitos), los priones, material genético de cualquier origen o sus derivados, como así también tejidos y fluidos de organismos vivos que porten o puedan portar ese material.

Si la actividad a realizar involucra la exposición a varios grupos de agentes biológicos se asume el riesgo en base al peligro presentado por todos los agentes biológicos presentes.

En el caso que se conozca el origen de las muestras a analizar y se pueda estimar la posible contaminación microbiológica, el análisis de riesgo se realiza sin mayores dificultades. Si las muestras son de origen desconocido se debe recabar la mayor información posible (procedencia, datos médicos del paciente, epidemiología, origen geográfico) y, en este caso, se deben tratar con la mayor prudencia.

En base a este análisis de riesgo biológico los microorganismos infecciosos se clasifican en *Grupos de Riesgo* y se emplea exclusivamente para el trabajo en laboratorio ^{(2) (4)}.

Grupos de Riesgo

Grupo de riesgo 1: *riesgo individual y poblacional escaso ó nulo.*

Incluye los microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedad en humanos ó animales

Grupo de riesgo 2: *riesgo individual moderado y riesgo poblacional bajo.*

Constituido por agentes patógenos que pueden provocar enfermedad en humanos ó animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, animales ó medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección pero aplicando medidas eficaces de tratamiento y prevención el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3: *riesgo individual elevado y riesgo poblacional bajo.*

Formado por agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas ó animales graves pero que, en general, no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces

Grupo de riesgo 4: *riesgo individual y poblacional elevado.*

En este grupo se encuentran los agentes patógenos que pueden provocar enfermedades graves en el ser humano ó animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa ó indirectamente. En general no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces. ⁽²⁾

Niveles de Bioseguridad

Las actividades que se pueden desarrollar con los microorganismos son:

- A: actividad que no multiplica ni disemina el microorganismo
- B: actividad que multiplica y/o disemina el microorganismo
- C: actividad con animales potencialmente infectados

De la relación entre las dos clasificaciones anteriores (Grupos de Riesgo y Tipo de actividad) se determina, para un listado de microorganismos, el Nivel de Bioseguridad (NB)

- NB 1: laboratorio básico:
- NB 2: laboratorio básico
- NB 3: laboratorio de contención
- NB 4: laboratorio de máxima contención ⁽⁶⁾

Ver la Tabla 1 en la cual se muestran los niveles de bioseguridad y las condiciones de las áreas laborales.

Tabla 1: Relación de los niveles de bioseguridad y condiciones de las áreas laborales ⁽²⁾⁽⁴⁾

	Niveles de Bioseguridad			
	1	2	3	4
Área separada de otras actividades	NO	NO	Recomendada	SI
Aire filtrado (HEPA)	NO	NO	SI c/extracción de aire	SI
Acceso restringido	NO	Recomendada	SI	SI
Área precintada para permitir desinfección	NO	NO	Recomendada	SI
Procedimiento de desinfección específico	NO	SI	SI	SI
Área con presión negativa	NO	NO	Recomendada	SI
Control de insectos y roedores	SI	Recomendada	SI	SI
Superficies impermeables y fáciles de limpiar con agua	SI	SI mesada	SI mesada y piso	SI mesada, piso, paredes, cielorraso
Superficies resistentes a ácidos, álcalis	SI	Recomendada	SI	SI
Almacenamiento seguro de los agentes biológicos	SI	SI	SI	SI
Ventana a través de la cual se puedan ver los ocupantes	NO	Recomendada	SI	SI
Equipos propios	NO	NO	Recomendada	SI
Eliminación especial de residuos	NO	Recomendada	SI	SI
Incinerador de animales	NO	Recomendada	SI	SI en el lugar
Manejar el material infectado, animales incluidos en cabinas de bioseguridad, aisladores u otra contención apropiada	NO	Recomendada	SI si ruta de infección es aérea	SI
Tratamiento de efluentes	NO	NO	SI	SI
Vestuario	NO	SI	SI	SI
Doble ducha	NO	NO	SI	SI

Para todos los Niveles de Bioseguridad y Grupos de riesgo el personal debe tener capacitación permanente y específica, con procedimientos escritos, para manipular los agentes patógenos, realizar la desinfección de las áreas y las condiciones de trabajo correspondientes. Cada Nivel de Bioseguridad incluye las medidas del nivel

anterior.

Señal de Peligro Biológico: A partir del *Grupo de riesgo 2* en adelante se coloca la señal de peligro biológico en las puertas de acceso al laboratorio ⁽²⁾. Ver Figura 1.

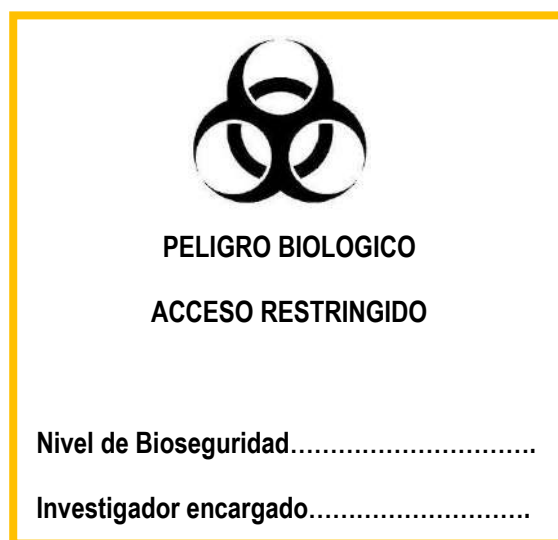


Figura 1: Señal de peligro biológico.

El *Nivel de Bioseguridad 1* corresponde a laboratorios cuyo diseño y construcción son adecuados para educación, capacitación universitaria. En éstos se trabaja con cepas definidas de microorganismos viables que no se conoce hasta el momento como generadores de enfermedad.

El *Nivel de Bioseguridad 2* refiere, al que suelen tener, por el tipo de microorganismos que manejan, los laboratorios de análisis clínicos, públicos y privados, centros de salud de atención primaria.

El *Nivel de Bioseguridad 3* debe emplearse cuando se manipulan agentes biológicos del grupo 3 que ocasionan patologías graves, de difícil y largo tratamiento, con secuelas.

El mayor y más frecuente peligro es la infección adquirida a través de aerosoles y fluidos biológicos

El *Nivel de Bioseguridad 4* se emplea cuando se trabaja con microorganismos exóticos de alta peligrosidad, capaces de producir infecciones graves y hasta mortales en el personal de laboratorio. Para todas las actividades de este nivel se requieren cabinas de seguridad biológica Clase III, prácticas microbiológicas rigurosas y un laboratorio con diseño especial para evitar la diseminación de microorganismos al medio ambiente⁽⁷⁾. Hasta el momento en la Argentina no se trabaja en este último nivel.

Agentes Biológicos ⁽⁴⁾

En la Tabla 2 se detallan los microorganismos según el Nivel de Bioseguridad.

- ◆ Se mencionan únicamente los agentes biológicos capaces de causar enfermedad en los seres humanos y se excluyen animales y plantas patógenos conocidos que no afectan al ser humano.
- ◆ Los microorganismos que no figuran en la siguiente lista, no implica necesariamente que están clasificados en el Grupo 1.
- ◆ Se aclara aquellos que son capaces de generar toxinas, alérgenos y si se dispone de vacuna.
- ◆ La sigla *spp* implica que existen otras especies patógenas para humanos
- ◆ Si una cepa está atenuada o ha perdido sus genes virulentos, no necesariamente aplica esta clasificación para sus descendientes y su uso queda sujeto a la evaluación del riesgo.

Tabla 2: Clasificación de los agentes biológicos según el nivel de bioseguridad (listado de la Comunidad Europea)
A: Bacterias – B: Virus – C: Parásitos – D: Hongos

Tabla 2 A. Agente biológico: BACTERIAS	Clasificación	Nota
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	2	
<i>Actinomadura madurae</i>	2	
<i>Actinomadura pelletieri</i>	2	
<i>Actinomyces gerenceriae</i>	2	
<i>Actinomyces israelii</i>	2	
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2	
<i>Actinomyces</i> spp.	2	
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (<i>Corynebacterium haemolyticum</i>)	2	
Bacillus anthracis	3	
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	
<i>Bartonella bacilliformis</i>	2	
<i>Bartonella quintana</i> (<i>Rochalimaea quintana</i>)	2	
<i>Bartonella</i> (<i>Rochalinea</i>) spp	2	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2	
<i>Bordetella parapertussis</i>	2	
Bordetella pertussis	2	V
<i>Borrelia burgdorferi</i>	2	
<i>Borrelia duttonii</i>	2	
<i>Borrelia recurrentis</i>	2	
<i>Borrelia</i> spp.	2	
Brucella abortus	3	
Brucella canis	3	
Brucella melitensis	3	
Brucella suis	3	
<i>Burkholderia mallei</i> (<i>Pseudomonas mallei</i>)	3	
Burkholderia pseudomallei (<i>Pseudomonas pseudomallei</i>)	3	
Campylobacter fetus	2	
Campylobacter jejuni	2	
Campylobacter spp.	2	
<i>Cardiobacterium hominis</i>	2	
Chlamydia pneumoniae	2	
Chlamydia trachomatis	2	
Chlamydia psittaci (cepas aviares)	3	
Chlamydia psittaci (otras cepas)	2	
Clostridium botulinum	2	T
<i>Clostridium perfringens</i>	2	
Clostridium tetani	2	T, V
<i>Clostridium</i> spp.	2	
Corynebacterium diphtheriae	2	T, V
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	2	
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	
Coxiella burnetii	3	
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	
<i>Ehrlichia sennetsu</i> (<i>Rickettsia sennetsu</i>)	2	
<i>Ehrlichia</i> spp.	2	

Tabla 2 A. Agente biológico: BACTERIAS	Clasificación	Nota
<i>Eikenella corrodens</i>	2	
<i>Enterobacter aerogenes/cloacae</i>	2	
<i>Enterobacter</i> spp.	2	
<i>Enterococcus</i> spp.	2	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	2	
<i>Escherichia coli</i> (excepto cepas no patogénicas)	2	
<i>Escherichia coli</i> , cepas verocitotoxigénicas (ej. O157:H7 o O103)	3 (*)	
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2	
<i>Fluoribacter bozemanii</i> (<i>Legionella</i>)	2	
<i>Francisella tularensis</i> (Tipo A)	3	
<i>Francisella tularensis</i> (Tipo B)	2	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	
<i>Haemophilus ducreyi</i>	2	
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	
<i>Haemophilus</i> spp.	2	
<i>Helicobacter pylori</i>	2	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	
<i>Klebsiella</i> spp.	2	
<i>Legionella pneumophila</i>	2	
<i>Legionella</i> spp.	2	
<i>Leptospira interrogans</i> (todas variantes Serológicas)	2	
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	
<i>Listeria ivanovii</i>	2	
<i>Morganella morganii</i>	2	
<i>Mycobacterium africanum</i>	3	V
<i>Mycobacterium avium/intracellulare</i>	2	
<i>Mycobacterium bovis</i> (excepto cepa BCG)	3	V
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2	
<i>Mycobacterium kansasii</i>	2	
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	
<i>Mycobacterium mageritense</i>	2	
<i>Mycobacterium marinum</i>	2	
<i>Mycobacterium microti</i>	3(*)	
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	2	
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	2	
<i>Mycobacterium simiae</i>	2	
<i>Mycobacterium szulgai</i>	2	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	V
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	3 (*)	
<i>Mycobacterium xenopi</i>	2	
<i>Mycoplasma caviae</i>	2	
<i>Mycoplasma hominis</i>	2	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	V
<i>Nocardia asteroides</i>	2	
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2	
<i>Nocardia farcinica</i>	2	
<i>Nocardia nova</i>	2	
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	2	

Tabla 2 A. Agente biológico: BACTERIAS	Clasificación	Nota
<i>Pasteurella multocida</i>	2	
<i>Pasteurella</i> spp.	2	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	
<i>Porphyromonas</i> spp.	2	
<i>Prevotella</i> spp.	2	
<i>Proteus mirabilis</i>	2	
<i>Proteus penneri</i>	2	
<i>Proteus vulgaris</i>	2	
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	
<i>Providencia rettgeri</i>	2	
<i>Providencia</i> spp.	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
<i>Rhodococcus equi</i>	2	
<i>Rickettsia akari</i>	3(*)	
<i>Rickettsia canada</i>	3(*)	
<i>Rickettsia conorii</i>	3	
<i>Rickettsia montana</i>	3(*)	
<i>Rickettsia typhi</i> (<i>Rickettsia mooseri</i>)	3	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	3	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	3	
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	3	
<i>Rickettsia</i> spp.	2	
<i>Salmonella arizonae</i>	2	
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	
<i>Salmonella paratyphi</i> A, B, C	2	V
<i>Salmonella typhi</i>	3(*)	V
<i>Salmonella</i> (otras variantes serológicas)	2	
<i>Serpulina</i> spp.	2	
<i>Shigella boydii</i>	2	
<i>Shigella dysenteriae</i> (Tipo 1)	3(*)	T
<i>Shigella dysenteriae</i>, (otro Tipo1)	2	
<i>Shigella flexneri</i>	2	
<i>Shigella sonnei</i>	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	2	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	
<i>Streptococcus suis</i>	2	
<i>Streptococcus</i> spp.	2	
<i>Treponema carateum</i>	2	
<i>Treponema pallidum</i>	2	
<i>Treponema pertenue</i>	2	
<i>Treponema</i> spp.	2	
<i>Vibrio cholerae</i> (incluido El Tor)	2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	
<i>Vibrio</i> spp.	2	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	
<i>Yersinia pestis</i>	3	V
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2	
<i>Yersinia</i> spp.	2	

Tabla 2 B. Agente biológico: VIRUS	Clasificación	Nota
<i>Adenoviridae</i>	2	
<i>Arenaviridae</i>		
Complejos virales LCM-Lassa: virus de la coriomeningitis (cepas no neurotrópicas):		
Virus Lassa	4	
Virus Linfocítico (cepas)	3	
Virus de la corio meningitis linfocítica (otras cepas)	2	
Virus Mopeia	2	
Otros complejos virales LCM-Lassa	2	
Complejos virales Tacaribe:		
Virus Guanarito	4	
Virus Junin	4	
Virus Sabia	4	
Virus Machupo	4	
Virus Flexal	3	
Otros complejos virales Tacaribe	2	
<i>Astroviridae</i>	2	
<i>Bunyaviridae</i>		
Belgrade (también conocido como Dobrava)	3	
Bhanja	2	
Virus Bunyamwera	2	
Germiston	2	
Virus Oropouche	3	
Sin Nombre (originalmente Canyon Muerto)	3	
Virus Encefalitis de California	2	
Hantavirus:		
Hantaan (Fiebre hemorrágica Corea)	3	
Virus Seoul	3	
Virus Puumala	2	
Virus Prospect Hill	2	
Otros hantavirus	2	
Nairovirus:		
Fiebre hemorrágica de Congo-Crimea	4	
Virus Hazara	2	
Phlebovirus:		
Fiebre del Valle del Rift	3	
Fiebre Sandfly	2	V
Virus Toscana	2	
Otros <i>bunyaviridae</i> de patogenicidad conocida	2	
<i>Caliciviridae</i>		
Virus Hepatitis E	3(*)	
Virus Norwalk	2	
Otros <i>Caliciviridae</i>	2	
<i>Coronaviridae</i>	2	
<i>Filoviridae</i>		
Virus Ebola	4	
Virus Marburg	4	
<i>Flaviviridae</i>		
Encefalitis de Australia (Murray Valley)	3	V
Virus de la Europa Central transmitida por garrapata	3(*)	
Absettarov	3	
Hanzalova	3	
Hypr	3	

Tabla 2 B. Agente biológico: VIRUS	Clasificación	Nota
Kumlinge	3	
Virus Dengue Tipo 1-4	3	
Virus Hepatitis C	3(*)	D
Virus Hepatitis G	3(*)	D
Encefalitis japonesa B	3	V
Kyasanur Forest	3	V
Louping ill	3(*)	
Omsk	3	V
Powassan	3	
Rocio	3	
Encefalitis rusa primavera - verano (TBE)	3	V
Encefalitis de San Luis	3	
Virus Wesselsbron	3(*)	
Virus Fiebre del Nilo Este	3	
Fiebre Amarilla	3	V
Otros flavivirus de patogenicidad conocida	2	
<i>Hepadnaviridae</i>		
Virus Hepatitis B	3(*)	V, D
Virus Hepatitis D (Delta)	3(*)	V, D
<i>Herpesviridae</i>		
Cytomegalovirus	2	
Virus Epstein-Barr	2	
Herpesvirus simiae (B virus)	3	
Virus Herpes simple tipos 1 and 2	2	
Herpesvirus varicella-zoster	2	
Virus linfotrópico humano B-I (HBLV-HHV6)	2	
Virus Herpes humano 7	2	
Virus Herpes humano 8	2	D
<i>Orthomyxoviridae</i>		
Virus Influenza tipos A, B y C	2	V
Tick-borne <i>orthomyxoviridae</i> : Dhori and Thogoto	2	
<i>Papovaviridae</i>		
Virus BK and JC	2	D
Virus Papiloma humano	2	D
<i>Paramyxoviridae</i>		
Virus de sarampión	2	V
Virus de paperas	2	V
Virus de Enfermedad de Newcastle	2	
Virus Parainfluenza tipos 1 a 4	2	
Virus Respiratory syncytial	2	
<i>Parvoviridae</i>		
Parvovirus Humano (B 19)	2	
<i>Picomaviridae</i>		
Virus de la conjuntivitis hemorrágica (AHC)	2	
Virus Coxsackie	2	
Virus Echo	2	
Virus Hepatitis A (enterovirus humano tipo 72)	2	V
Virus Polio	2	V
Virus Rhino	2	
<i>Poxviridae</i>		
Virus Viruela de búfalo	2	
Virus Viruela de vaca	2	
Virus Viruela de elefante	2	

Tabla 2 B. Agente biológico: VIRUS	Clasificación	Nota
Virus Milkers' node	2	
<i>Virus Molluscum contagiosum</i>	2	
Virus de viruela del mono	3	V
Virus Orf	2	
Virus de la viruela del conejo	2	
Virus Vaccinia	2	
Virus Variola (mayor y menor)	4	V
Virus Viruela blanca ('virus Variola')	4	V
Virus Yatapox (Tana & Yaba)	2	
<i>Reoviridae</i>		
Coltivirus	2	
Rotavirus humano	2	
Virus Orbi	2	
Virus Reu	2	
<i>Retroviridae</i>		
Virus Inmunodeficiencia Humana	3(*)	D
Virus linfotrópico humano células T (HTLV), tipos 1 and 2	3(*)	D
SIV	3(*)	
<i>Rhabdoviridae</i>		
Virus de la rabia	3(*)	V
Virus de la Estomatitis vesicular	2	
<i>Togaviridae</i>		
Alfavirus	3	V
Encefalomiелitis equina del Este	2	
Virus Bebaru	3(*)	
Virus Chikungunya	3(*)	
Virus Everglades	3	
Virus Mayaro	3(*)	
Virus Mucambo	3	
Virus Ndumu	2	
Virus O'nyong-nyong	2	
Virus del rio Ross	2	
Virus Semliki Forest	2	
Virus Sindbis	3(*)	
Virus Tonate	3	V
Encefalomiелitis equina de Venezuela	3	V
Encefalomiелitis equina del Oeste	2	
Otros alfavirus conocidos	2	V
Rubivirus (rubella)	2	
<i>Toroviridae</i>		
Virus no clasificados	4	
Morbillivirus equino	3(*)	D
Virus Hepatitis aún no identificados		
Agentes no convencionales asociados con encefalopatías espongiforme transmisible (EsET)	3(*)	D
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	3(*)	D
Variante de la Enfermedad Creutzfeldt-Jakob	3(*)	D
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y otras relacionadas con animales (EsET):	3(*)	D
Síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker Kuru	3(*)	D

Tabla 2 C. Agente biológico: PARÁSITOS	Clasificación	Nota
<i>Acanthamoeba castellani</i>	2	A A
<i>Ancylostoma duodenale</i>	2	
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	2	
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	2	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	
<i>Ascaris suum</i>	2	
Babesia divergens	2	
Babesia microti	2	
<i>Balantidium coli</i>	2	
<i>Brugia malayi</i>	2	
<i>Brugia pahangi</i>	2	
<i>Capillaria philippinensis</i>	2	
<i>Capillaria</i> spp.	2	
<i>Clonorchis sinensis</i>	2	
<i>Clonorchis viverrini</i>	2	
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2	
Cryptosporidium spp.	2	
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	2	
<i>Dipetalonema streptocerca</i>	2	
Diphyllobothrium latum	2	
<i>Dracunculus medinensis</i>	2	
Echinococcus granulosus	3(*)	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	3(*)	
<i>Echinococcus vogeli</i>	3(*)	
Entamoeba histolytica	2	
Fasciola gigantica	2	
Fasciola hepática	2	
<i>Fasciolopsis buski</i>	2	
Giardia lamblia (<i>Giardia intestinalis</i>)	2	
<i>Hymenolepis diminuta</i>	2	
Hymenolepis nana	2	
Leishmania brasiliensis	3(*)	
Leishmania donovani	3(*)	
Leishmania ethiopica	2	
Leishmania mexicana	2	
Leishmania peruviana	2	
Leishmania tropica	2	
Leishmania major	2	
Leishmania spp.	2	
<i>Loa loa</i>	2	
<i>Mansonella ozzardi</i>	2	
<i>Mansonella perstans</i>	2	
<i>Naegleria fowleri</i>	3	
<i>Necator americanus</i>	2	
<i>Onchocerca volvulus</i>	2	
<i>Opisthorchis felinus</i>	2	
<i>Opisthorchis</i> spp.	2	
<i>Paragonimus</i> spp. <i>termani</i>	2	
<i>Plasmodium falciparum</i>	3(*)	
<i>Plasmodium</i> spp. (human and simian)	2	
Sarcocystis suihominis	2	
Schistosoma haematobium	2	
Schistosoma intercalatum	2	

Tabla 2 C. Agente biológico: PARÁSITOS	Clasificación	Nota
Schistosoma japonicum	2	
Schistosoma mansoni	2	
Schistosoma mekongi	2	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	2	
<i>Strongyloides</i> spp.	2	
Taenia saginata	2	
Taenia solium	3(*)	
<i>Toxocara canis</i>	2	
Toxoplasma gondii	2	
<i>Trichinella spiralis</i>	2	
<i>Trichuris trichiura</i>	2	
Trypanosoma brucei brucei	2	
Trypanosoma brucei gambiense	2	
Trypanosoma brucei rhodesiense	3(*)	
Trypanosoma cruzi	3	
<i>Wuchereria bancrofti</i>	2	

Tabla 2D. Agente biológico: HONGOS	Clasificación	Nota
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	A
Blastomyces dermatitidis / <i>Ajellomyces dermatitidis</i>	3	
<i>Candida albicans</i>	2	A
<i>Candida tropicalis</i>	2	
<i>Cladophialophora bantiana</i> (formerly: <i>Xylohypha bantiana</i> , <i>Cladosporium bantianum</i> o <i>trichoides</i>)	3	
Coccidioides immitis	3	A
Cryptococcus neoformans var. <i>neofonnans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>neofonnans</i>)	2	A
Cryptococcus neoformans var. <i>gattii</i> (<i>Filobasidiella bacillispora</i>)	2	A
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>parva</i>	2	
<i>Emmonsia parva</i> var. <i>crescens</i>	2	
Epidermophyton floccosum	2	A
<i>Fonsecaea compacta</i>	2	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	2	
Histoplasma capsulatum var. <i>capsulatum</i> (<i>Ajellomyces capsulatus</i>)	3	
Histoplasma capsulatum <i>duboisii</i>	3	
<i>Madurella grisea</i>	2	
<i>Madurella mycetomatis</i>	2	
Microsporum spp.	2	A
<i>Neotestudina rosatii</i>	2	
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3	
<i>Penicillium marneffei</i>	2	A
<i>Scedosporium apiospermum</i> (<i>Pseudallescheria boydii</i>)	2	
<i>Scedosporium prolificans</i> (<i>inflatum</i>)	2	
Sporothrix schenckii	2	
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	
Trichophyton spp.	2	

Abreviaturas empleadas: A: posible efecto alergizante - D: se dispone de lista de operadores expuestos al microorganismo y de lo cual han transcurrido más de 10 años - T: producción de toxina - V: vacuna disponible
 (*) Riesgo limitado de infección al operador pues su ruta de infección no es aérea.

Comparación de la clasificación de agentes biológicos según la Comunidad Europea y las Normas IRAM

Las bacterias y hongos que figuran en las Normas IRAM están incluidos en la Tabla 2, señalados en negrita.

Los microorganismos Parásitos y Priones que están en las dos clasificaciones están indicados en negrita.

En la Tabla 3 se indican los agentes biológicos (Parásitos y Priones) que figuran en las Normas IRAM y que no están incluidos en el listado anterior. Se agrega el listado de los virus que aparecen en las Normas IRAM.

Tabla 3: Otros agentes biológicos. Normas IRAM.

Agente biológico	Clasificación
PARASITOS	
Nematodos	2
Protozoarios	
<i>Anaplasma spp</i>	2
<i>Coccidia spp</i>	2
<i>Eimeria spp</i>	2
<i>Pnuemocystis carinii</i>	2
<i>Sarcosporidium spp</i>	2
<i>Trichonoma spp</i>	2
Cestodes	
<i>Dipylidium caninum</i>	2
PRIONES	
Scrapie	3
VIRUS	
Enterovirus bovino	1
Hepatitis canina	1
Anemia infecciosa equina	2
Arteritis viral equina	2
Bronquitis infecciosa aviar	2
Calciavirus felino	2
Coriomeningitis linfocitaria	2
Coronavirus bovino	2
Diarrea viral bovina	2
Distemper canino	2
Encefalomiелitis aviar	2
Enfermedad de Aujeszky	2
Enfermedad de Gumboro	2
Enfermedad de Marek	2
Enfermedad hemorrágica del conejo	2
Enteritis del pato	2
Enterovirus porcino	2
Estomatitis papular	2
Fiebre catarral maligna	2
Gastroenteritis transmisible	2
Hepatitis A, B y D	2
Hepatitis C y E	2
Hepatitis del pato	2
Herpes canino	2
Herpes humanos	2
Herpes virus equino	2
Influenza	2
Influenza equina	2
Laringotraqueitis infecciosa	2
Leucosis bovina	2

Agente biológico	Clasificación
VIRUS	
Maedi Visna	2
Mamilitis bovina	2
Mixomatosis	2
Panleucopenia felina	2
Papiloma bovino	2
Parainfluenza 3	2
Parvovirus bovino	2
Parvovirus canino	2
Parvovirus porcino	2
Peritonitis felina	2
Poliovirus	2
Poxvirus	2
Rabia virus fijo	2
Retrovirus (HIV)	2
Rinoneumonitis equina	2
Rinotraqueitis infecciosa bovina	2
Rinovirus equino	2
Rotavirus bovino	2
Vaccinia	2
Artritis y encefalitis caprina	3
Ectromelia	3
Encefalitis de San Luis	3
Encefalitis equina del Este	3
Encefalitis equina del Oeste	3
Encefalitis japonesa	3
Enfermedad de Newcastle	3
Enfermedad vesicular del cerdo	3
Estomatitis vesicular	3
Fiebre aftosa	3
Influenza aviar	3
Louping ill	3
Lumpy skin	3
Metritis contagiosa equina	3
Peste bovina	3
Peste de los pequeños rumiantes	3
Peste equina africana	3
Peste porcina africana	3
Peste porcina clásica	3
Pleuroneumonía bovina	3
Rabia virus calle	3
Síndrome respiratorio y reproductivo porcino	3
Viruela ovina y caprina	3
Fiebre hemorrágica Congo-Crimea	4
Complejos de virus de enfermedades transmitidas por garrapatas	4
Marburg	4
Ebola	4
Lassa	4
Junín	4
Machupo	4
Guanarito	4
Fiebre del valle del Rift	4
Herpes simiano	4

Conclusiones

Es muy importante tomar conciencia de los riesgos que implica el mal uso de los materiales biológicos y reactivos.

Cada laboratorio deber realizar un programa, con procedimientos escritos, que proporcione el empleo de prácticas de seguridad y custodia de los agentes biológicos que maneja, a fin de proteger al operador, al medio ambiente y a la población de la exposición a los microorganismos y sustancias tóxicas, a fin de evitar infecciones, aparición y/o propagación de enfermedades.

La capacitación periódica del personal tiene un rol fundamental en la prevención de accidentes físicos, químicos y biológicos y cada analista debe conocer los alcances, en materia de Bioseguridad, de su profesión.

La Bioseguridad absoluta es inalcanzable y solamente empleando las técnicas adecuadas para cada tipo de actividad, identificando los peligros antes de la implementación de las normas, se pueden reducir los peligros antes mencionados.

Bibliografía

1. Norma IRAM 80059. Publicación del Instituto Argentino de Normalización. Bs. As. Argentina. 2000
2. *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. 3 ed. OMS 2005
3. *Biorisk Management: Laboratory Biosecurity Guidance* OMS. 2006
4. Directive of the European Parliament and of the council. 2000 /54/EC.
5. Casimiro, A. M. *Niveles de riesgo y condiciones de bioseguridad en el laboratorio clínico Subcomisión de Bioseguridad AAM* 2005.
6. Micucci, Horacio A. *Niveles de Bioseguridad en Microbiología*. La Norma IRAM 80059. Publicación del Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 35(4) 515-519, 2001
7. Mazzali, L. R. *Nivel 4 de Bioseguridad*. Publicación Revista Sociedad de Microbiología de Venezuela 25(1). 50-53, 2005
8. Publicación Unidad 2. *Bioseguridad*. Facultad Cs. Químicas y Farmacéuticas. UNR 2009

Publicado y editado en Buenos Aires

Año 2013

Por:

Subcomisión de Buenas Prácticas



de la

División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (DAMyC).



Para su difusión gratuita a través de la página

www.aam.org.ar

para contribuir con la práctica en la industria y enseñanza en las universidades,
de la Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica,
cosmética y de productos médicos

ISBN 978-987-26716-3-1