

Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica

Validation and implementation of a methodology for the microbiological analysis of a preserved liquid product produced in a pharmaceutical industry

MSc. Janeth Arias Palacios,^I Lic. Diana Sofía Ortiz Gómez,^{II} Lic. Adriana González Acero^{II}

^I Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

^{II} Laboratorio Aseguramiento de la Calidad. Merck, Colombia.

RESUMEN

Objetivo: validar e implementar una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado con parabenos, elaborado en una industria farmacéutica, según las técnicas de análisis propuestas por la United States Pharmacopeia (USP), versión XXXIV, 2011.

Métodos: para los ensayos cuantitativos se trabajó con *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y para los ensayos cualitativos con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Resultados: se obtuvieron resultados acordes con lo establecido por la USP. La metodología descrita se consideró reproducible y robusta al tener la capacidad de no ser afectada por variaciones al desarrollar la técnica, lo cual genera resultados confiables y precisos.

Conclusiones: todos los parámetros de validación cumplen la especificación según la USP, lo que muestra conformidad en la totalidad de los parámetros evaluados.

Palabras clave: análisis microbiológico, exactitud, límite de detección, linealidad, precisión, robustez, validación.

ABSTRACT

Objective: to validate and to implement a methodology for microbiological analysis of a liquid product preserved with parabens produced by a pharmaceutical company, based on the United States Pharmacopeia analytical methods, XXXIV version, 2011.

Methods: the quantitative tests were carrying out for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, and qualitative tests for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Results: the results were consistent with those established by the USP. The described methodology was considered reproducible and robust because of its capacity of being unaffected by variations when implementing the technique, thus generating reliable and accurate results.

Conclusions: all validation parameters met the USP specification, showing compliance with all the evaluated parameters.

Key words: microbiological analysis, accuracy, detection limit, linearity, precision, robustness, validation.

INTRODUCCIÓN

La validación de un método microbiológico es un proceso importante para la implementación de una técnica analítica microbiológica, pues se logra establecer de forma experimental que las características su desempeño cumplen con los requisitos para la aplicación prevista.¹ Para esto se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

Especificidad. La especificidad de un método microbiológico es la capacidad para detectar una gama de microorganismos que pueden estar presentes en la muestra.¹

Límite de detección. El límite de detección es el número más bajo de microorganismos en una muestra que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas.¹

Robustez. La robustez de un método microbiológico cualitativo es la medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas.¹

Exactitud. La exactitud es la proximidad de los resultados de la prueba obtenidos mediante el método de prueba respecto a los obtenidos por el método tradicional.²

Precisión. La precisión de un método microbiológico cuantitativo es el grado de coincidencia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestreos múltiples de suspensiones de microorganismos de laboratorio a lo largo del intervalo de la prueba.¹

Linealidad. La linealidad para otros autores es considerada también como un proceso analítico donde existe la posibilidad de que este produzca resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.²

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es la validación y la implementación de la técnica de análisis microbiológico para un producto líquido preservado, con el fin de asegurar que el procedimiento utilizado para el recuento total de microorganismos y

la ausencia/presencia de *Escherichia coli*, es el adecuado en el control de calidad del producto farmacéutico mencionado.

MÉTODOS

Método cuantitativo para recuento de bacterias mesófilos aerobios, hongos y levaduras

Ensayo general. Se transfirió 1 mL de la concentración a trabajar del microorganismo de ensayo y se inoculó en 90 mL de caldo caseína digerida-soya-lectina polisorbato 20 mL y 10 mL de muestra. Simultáneamente se realizó un control positivo con la misma concentración del ensayo en 100 mL de caldo lecitina polisorbato 20.

Se utilizó como microorganismo estándar: *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Exactitud. Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general, para lo cual se realizaron de forma individual 10 réplicas. Posteriormente se realizó análisis de varianzas (ANOVA) y prueba t de Student, y se obtuvo el porcentaje de recuperación según los criterios que exige la USP.

Precisión

Precisión del método. Se transfirió 1 mL de la concentración a trabajar del microorganismo de ensayo y se inoculó en 100 mL de caldo caseína digerida-soya-lectina polisorbato; el procedimiento se repitió 10 veces. A continuación se determinó el coeficiente de variación de las réplicas y se halló las medias de cada una de las diluciones de las réplicas del ensayo.

Precisión intermedia (repetitividad). Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general con la variante de incluir en los ensayos de precisión un analista No. 2 y el desarrollo de la metodología entre días. Se realizaron 10 réplicas del mismo

Selectividad. Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general y se repitió el procedimiento tres veces. A partir de los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de recuperación como criterio exigido por la USP. Los microorganismos utilizados en dicha prueba fueron: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

Robustez. Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general tres veces de forma individual. En el ensayo de recuento de bacterias, las réplicas se incubaron en dos incubadoras diferentes, las cuales estaban calibradas entre 30 °C y 35 °C de temperatura. En el ensayo de recuento de hongos y levaduras, la siembra se realizó en agar sabouraud al 4 % y en agar PDA.

Método cuantitativo para ausencia/presencia de *Escherichia coli*

Robustez. Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general con el microorganismo *Escherichia coli*, a una concentración aproximada de 100 UFC/mL. Se trabajó con tres periodos de incubación diferentes, 24, 17 y 26 h; simultáneamente se llevó para cada una de estas horas ensayadas controles de los caldos, definidos

como controles positivos y resiembras en los medios selectivos para el microorganismo ensayado.

Linealidad. Se desarrolló la metodología descrita en el ensayo general con los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. A partir de cada inóculo se procedió a realizar diluciones decimales seriadas en base 10 (10^{-1} a 10^{-10}). A partir de cada concentración se sembró 1ml por triplicado y se adicionó 15 ± 5 mL de agar CASOY con TTC al 1 %, fundido a una temperatura no mayor de 45 °C. Una vez solidificado el medio se realizó la curva de crecimiento UFC (unidades formadoras de colonias) vs. niveles de concentración y se determinó el coeficiente de correlación al cuadrado de cada uno de los microorganismos ensayados.

Límite de detección. A partir del ensayo de linealidad se tomó la concentración donde se obtuvo el menor crecimiento en placa y la subsiguiente dilución decimal en la cual no se registró crecimiento. Posteriormente se realizaron siembras masivas de cada uno de los ensayos con el fin de evidenciar la presencia del microorganismo.

Especificidad. Se tomó como base los resultados expresados en el parámetro descrito como límite de detección. Luego de llevar los caldos del ensayo a incubación por 24 h, se realizaron resiembras en medios de cultivo selectivos para cada microorganismo a ensayar con asa redonda.

Para la validez de la prueba se tomó dos microorganismos como controles negativos; *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, a los cuales se les aplicó la misma metodología anteriormente mencionada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede constatar según el porcentaje de recuperación que cada uno de los microorganismos obtenidos es capaz de crecer en presencia del producto preservado con parabenos, gracias a la acción inactivante del polisorbato presente en el caldo nutritivo usado en la validación (caldo lecitina polisorbato 20).

Se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 90 %, y los menores se alcanzaron en dos de las réplicas de *Aspergillus niger* con un valor de 90 % y 93 %, aun cumpliendo con lo establecido en la USP, en la que se establece un porcentaje mayor al 70 % para dar cumplimiento a dicho parámetro.

Lo anterior se debe a la acción de los parabenos ya que estos presentan un amplio espectro frente a hongos y levaduras, aunque también poseen actividad antimicrobiana.³ Los demás microorganismos ensayados presentaron porcentajes de recuperación mayores al 95 %, por tanto se puede comprobar que la metodología posee la capacidad de detectar una gama de microorganismos presentes en la muestras.¹

Al evaluar la exactitud se demostró por medio de la recuperación microbiana que la metodología propuesta presenta en todas las réplicas recuentos muy homogéneos entre sus ensayos con presencia del producto o sin esta. Los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* mostraron la capacidad de crecer en presencia del producto preservado gracias a la inactivación de los parabenos por la actividad del Polisorbato presente en el caldo nutritivo utilizado en la prueba (caldo lecitina polisorbato 20) tal como lo señala la USP, la cual indica la inactivación de los

preservantes parabenos por parte del polisorbato.^{1,3} El método propuesto también demostró ser preciso teniendo presente que los coeficientes de variación obtenidos a partir de los recuento fueron de valor menor al exigido por la USP, 35 % (tabla 1).

Tabla 1. Promedios de los recuentos del microorganismo estándar: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en la prueba cuantitativa de precisión del intermedia

	Analista No.1 Día No.1	Analista No.1 Día No.2	Analista No.2
	Promedio de recuentos UFC/mL	Promedio de recuentos UFC/mL	Promedio de recuentos UFC/mL
Estándar	462	441	481
Réplicas ensayo	460	476	467
DE réplicas	7	34,2	56,8
CV réplicas	1,5 %	7,2 %	12,2 %

Al evaluar la robustez de la metodología propuesta en los métodos cuantitativos, se obtuvo como resultado en el ensayo de recuento de bacterias mesófilas aerobias que los promedios de los controles positivos están muy cerca y su diferencia radica en tan solo 12 UFC/mL; el mayor recuento se alcanzó en el estándar incubado en la incubadora *Lab-line*.

Teniendo presente que el ensayo se realizó con el mismo inóculo para ambos estándares, se puede evidenciar cómo los recuentos entre ensayos no difieren más del 10 % entre los porcentajes de recuperación de las réplicas del ensayo y los controles positivos. Lo anterior se verifica con el valor tan bajo y cercano de los coeficientes de variación para el ensayo en la incubadora *Lab-Line* y *Memmert TV-30*, que fue de 4,4 % y 3,8 % respectivamente.

En el caso del ensayo de recuento de hongos y levaduras se obtuvieron resultados conformes. En los ensayos sembrados con agar sabouraud y PDA se evidenció un porcentaje de recuperación mayor al 100 %. Los recuentos obtenidos en el ensayo con agar sabouraud mostraron un coeficiente de variación menor que en el ensayo con agar PDA, de 7,9 % y 18 % respectivamente; lo cual indica que ambos ensayos presentaron homogeneidad en los recuentos aun cuando el ensayo con agar PDA presentó un coeficiente de variación de mayor valor.

En los ensayos realizados para los métodos cuantitativos para el microorganismo *Escherichia coli*, los resultados obtenidos estuvieron conformes con los criterios establecidos por la USP.30, 2007. En el parámetro de linealidad los microorganismos ensayados (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) mostraron que son capaces de crecer en forma consistente a la concentración inoculada en presencia del producto. Al realizar la regresión lineal para los recuentos obtenidos, *Escherichia coli* presentó un $R^2 = 0,99$, *Staphylococcus aureus* un $R^2 = 0,97$ y *Pseudomonas aeruginosa* un $R^2 = 0,98$, lo cual indica la tendencia de los datos a la línea recta.

En este orden, se puede concluir que el ensayo realizado para los tres microorganismos patógenos presentó conformidad con el parámetro evaluado ya que se logró obtener

R² cercanos al valor teórico uno; aun cuando la USP, no indica un valor exacto para dicho R².

Según la evaluación del límite de detección y especificidad, los datos obtenidos muestran cómo la recuperación de los microorganismos en la dilución 10⁻⁷ presenta un crecimiento satisfactorio teniendo en cuenta la concentración inicial inoculada. *Staphylococcus aureus* mostró una recuperación >1 600 UFC/mL (dilución 10⁻⁷) y 0 UFC/mL (dilución 10⁻⁸) pasadas 24 h de incubación (tabla 2); se destaca la capacidad del caldo de enriquecimiento para recuperar el microorganismo de ensayo. De igual manera se presentó la recuperación de *Escherichia coli*, inoculando inicialmente un promedio de células de 4 x 10⁻⁷ UFC/mL (dilución 10⁻⁷), para un recuento final >1 600 UFC/mL y 0 UFC/mL (dilución 10⁻⁸) (tabla 3).

Tabla 2. Parámetro cualitativo: límite de detección.
Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Concentración	Réplica No. 1 UFC/mL	Réplica No. 2 UFC/mL	Réplica No. 3 UFC/mL	Promedio Recuento UFC/mL 24 h después
1,00E-07	3	3	3	>1600
1,00E-08	0	0	0	No recuento

Tabla 3. Parámetro cualitativo: límite de detección.
Microorganismo: *Escherichia coli* ATCC 8739

Concentración	Réplica No. 1 UFC/mL	Réplica No. 2 UFC/mL	Réplica No. 3 UFC/mL	Promedios Recuento UFC /mL 24 h después
1,00E-07	4	4	4	>1600
1,00E-08	0	0	0	No recuento

Tabla 4. Parámetro cualitativo: límite de detección.
Microorganismo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Concentración	Réplica No. 1 UFC/mL	Réplica No. 2 UFC/mL	Réplica No. 3 UFC/mL	Promedio de recuento UFC/mL 24 h después
1,00E-07	2	2	2	>1 600
1,00E-08	0	0	0	No recuento

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* se inoculó un promedio de 2 x 10⁻⁷ UFC/mL (dilución 10⁻⁷) para un un recuento final >1 600 UFC/mL y 0 UFC/mL (dilución 10⁻⁸) (tabla 4). Teniendo en cuenta los recuentos finales de cada uno de los microorganismos, se puede constatar su capacidad de recuperarse y crecer en presencia de producto a lo largo de un tiempo de enriquecimiento e incubación.

En el ensayo de especificidad se logró confirmar la presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y la ausencia de estos en la dilución 10^{-8} de forma cualitativa, lo cual hace pensar que en las diluciones siguientes a 10^{-9} y 10^{-10} también presentarán resultados de ausencia para cada uno de los microorganismos ensayados.

En el ensayo de robustez para *Escherichia coli*, se demostró la capacidad del caldo lecitina polisorbato 20 para favorecer la recuperación del microorganismo desde la hora 17 de incubación, evidenciada por la turbidez del caldo y por las pruebas confirmatorias. De esta manera se demuestra la robustez del método en cuanto a la estimación cualitativa de microorganismo *Escherichia coli* teniendo en cuenta que se comprobó la presencia de este en los tres diferentes tiempos ensayados. Por lo tanto, se puede afirmar que el ensayo es robusto, lo cual indica que en los distintos tiempos de incubación evaluados, en presencia del producto preservado con parabenos, el microorganismo no presenta inhibición.

De esta forma, se determina que la metodología propuesta en este trabajo y una vez validada posee la capacidad de presentar datos confiables en el análisis de control de calidad microbiana de un producto preservado con parabenos, con las mismas características del producto con que se desarrolló la validación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The United States Pharmacopeia. USP 34. The National Formulary, NF 29. The United States Pharmacopeia. The official compendia of standards. Rockville: Mack Printing; 2011.
2. WHO. Quality assurance of pharmaceuticals. Vol 2. Good manufacturing practices and inspection. Geneva: World Health Organization; 2010. p. 27-39.
3. Arthur K. Handbook of Pharmaceutical Excipients. London: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press; 3th ed. 2000. p. 340-2, 450-2, 510.

Recibido: 27 de diciembre de 2012.

Aprobado: 30 de enero de 2013.

Janeth Arias-Palacios. Pontificia Universidad Javeriana. Carretera 7ª No. 43-82. Edificio 51 Carlos Ortiz, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: jdcarias@javeriana.edu.co