

# Utilización de métodos microbiológicos rápidos validados en el contexto de la Estrategia de Control de la Contaminación del Anexo 1 de las GMP

Felix Thiele y Santiago Fernández

BWT Pharma & Biotech

## 1. El nuevo anexo 1 de las GMP

El agua es el excipiente más importante en la industria farmacéutica. La comprobación de la pureza microbiológica del agua purificada es una parte importante del control de calidad en la producción farmacéutica. Tradicionalmente, esto se hace con la prueba de la placa. Un procedimiento que existe en sus características básicas desde hace 130 años. [1].

El nuevo Anexo 1 de las GMP [2] que entrará en vigor el próximo 25<sup>th</sup> de agosto de 2023, exige claramente la aplicación de una estrategia holística de control de la contaminación (CCS) y también hace hincapié en el uso de *métodos microbiológicos rápidos* (RMM), también conocidos como analizadores de biocarga del agua en línea (OWBA), para aumentar la protección de los productos y agilizar la detección de la contaminación microbiana.

Con el RMM, tanto las secuencias de procesos como los PNT (*procedimientos operativos normalizados*) pueden evaluarse microbiológicamente con poco esfuerzo y mejorarse en consecuencia. De este modo, pueden contribuir a la implantación de la CCS en las fábricas.

## 2. Validación de los RMM

El Anexo 1 hace hincapié en la necesidad de validar los RMM cuando se utilizan para fines de fabricación general. Esta validación debe realizarse de acuerdo con las farmacopeas y la PDA TR-33, además los métodos microbiológicos alternativos deben ser capaces de detectar un panel de bacterias farmacéuticas relevantes (USP <1223>; Ph. Eur. 5.1.6; PDA TR-33).

En particular, sólo los RMM que hayan completado satisfactoriamente las pruebas requeridas en el Ph. Eur. 5.1.6 son aptos para su uso según el nuevo Anexo 1. Esta conformidad requiere el cumplimiento de las diferentes pruebas incluidas en el proceso de validación (tabla 1) y la prueba satisfactoria de los diferentes parámetros incluidos en el 5.6.1 (tabla 2).

Cualquier producto que no haya completado este proceso no es apto para su uso bajo la Ph. Eur. para los propósitos incluidos en el Anexo 1 de las GMPs.

Activity	Normally carried out by	
	Supplier	User
Primary validation	+	-(1)
URS (instrument, application)	-	+
Description of the technique	+	-(2)
Risk benefit analysis	-(3)	+
Design qualification (DQ)	-	+
Installation qualification (IQ)	-(4)	+
Operational qualification (OQ)	-(4)	+
Performance qualification (PQ):		
- verification of primary validation data given by the supplier;	-	+
- verification for the intended use (e.g. sterility testing, TAMC/TYMC, ...);	-	+
- method suitability test	-	+

Cuadro 1 (Fuente: Ph. Eur 5.1.6)

Criterion	Qualitative test	Quantitative test	Identification test
Accuracy	+ <sup>(1)</sup>	+	+
Precision	-	+	-
Specificity	+	+	+
Detection limit	+	- <sup>(2)</sup>	-
Quantitation limit	-	+	-
Linearity	-	+	-
Range	-	+	-
Robustness	+	+	+
Suitability testing	+	+	-
Equivalence testing	+	+	-

Cuadro 2 (Fuente: Ph. Eur 5.1.6)

### 3. Control microbiológico de PW y WFI

El agua es el excipiente más importante en la industria farmacéutica y se utiliza principalmente en los grados de calidad agua purificada (PW) y agua para inyectables (WFI). Se utiliza en los procesos de enjuague y en los productos estériles y no estériles. El control de calidad se realiza en función de varios parámetros definidos en las farmacopeas [3] [4].

Las pruebas microbiológicas tienen un papel especial en este caso, ya que es el parámetro de control de calidad que se determina mayoritariamente de forma manual incluso hoy en día. Mientras que otros parámetros, como la conductividad o el TOC, se controlan continuamente dentro del proceso, las muestras para la microbiología se toman individualmente en puntos de muestreo definidos.

Para llevar a cabo el método de la farmacopea, también conocido como prueba en placa, la muestra se filtra a través de una membrana. A continuación, se realiza un período de incubación de cinco días en un medio nutritivo y, de nuevo, el recuento manual de las unidades formadoras de colonias (UFC). En consecuencia, el tiempo de reacción es largo en caso de contaminación microbiológica y demasiado largo en el caso de procesos críticos o productos caros. Por estas y otras razones, el interés por la RMM en el mercado ha crecido notablemente en los últimos años, lo que también puede verse en la fusión de grupos de interés interempresariales y en las publicaciones de la OWBA [5]. Las empresas oferentes también están notando claramente el aumento del número de consultas sobre el tema de los RMMs. El mayor interés en el tema por parte de los usuarios se ve ciertamente reforzado por la publicación de documentos de la parte oficial. Todas las farmacopeas importantes y otras instituciones farmacéuticas relevantes han publicado los documentos o directrices correspondientes (por ejemplo, PDA, Ph. Eur. , USP y EMA).

#### 3.1. El RMM en el mercado farmacéutico

Desde su propia perspectiva, todo lector puede entender que la seguridad del paciente, y por tanto la seguridad de los productos, es de suma importancia para las empresas farmacéuticas. Las retiradas de productos por contaminación microbiológica son, a pesar de todas las precauciones, un problema habitual y siguen siendo uno de los mayores retos de la industria farmacéutica. [6]. Por lo tanto, los procesos existentes para la validación de métodos son muy importantes y obviamente justificables, pero también conducen a procesos de evaluación que consumen mucho tiempo. Aquí es donde los fabricantes de RMM pueden apoyar a los usuarios con datos de validación primaria para reducir su esfuerzo interno y simplificar y acelerar la validación.

Otro reto es, sin duda, las diferentes unidades del RMM en comparación con el método de la farmacopea, pero esto no es considerado un problema por las farmacopeas. [7] [8]. En este entorno comprensiblemente conservador, las innovaciones tardan en imponerse y la única forma de

establecer nuevos métodos es mediante pruebas de dispositivos. Incluso estas pruebas implican un esfuerzo interno, y a menudo no está claro cómo puede desplegarse y probarse la RMM de forma más útil. El siguiente texto ofrece una visión general de las diferentes posibilidades de uso de la RMM. Los ejemplos muestran la cantidad de información adicional útil que puede generarse con RMM y cómo esto puede apoyar el CCS requerido por el Anexo 1 de las GMP.

## 4. Aplicaciones de la RMM validada

Una de las cuestiones que se plantean en el debate sobre los RMM es la forma en que deben utilizarse. Los usos más comúnmente discutidos son para la liberación del producto o como monitorización adicional en paralelo al método compendial. Ambas formas de uso suelen estar respaldadas por los documentos pertinentes, según los cuales los dispositivos de medición deben someterse a una validación primaria antes de su uso. [8]. Debido a la escasa difusión hasta ahora, se dispone de poca experiencia para ambas formas de uso en el mercado, si se compara, por ejemplo, con la medición en línea del TOC.

Aparte de las dos variantes mencionadas, también existen las posibilidades de optimización del proceso y de la planta, que han sido menos discutidas hasta ahora. En este caso, el objetivo no es controlar el cumplimiento de un valor límite definido, sino el uso selectivo de la RMM en situaciones definidas o durante determinados pasos del proceso para evaluarlos mejor desde el punto de vista microbiológico y mejorarlos posteriormente.

En las siguientes secciones, las posibilidades mencionadas se discuten individualmente y se ilustran en parte con ejemplos de pruebas internas. El RMM utilizado fue un citómetro de flujo que tiñe automáticamente las células con un colorante específico para el ADN. A continuación, se cuenta el número de células y se indica como "recuento de células intactas/ml" o "ICC/ml". Los resultados proceden de una instalación de pruebas no cualificada y no representan la calidad esperada de una instalación de agua ultrapura en funcionamiento óptimo.

### 4.1. Liberación del producto tras la validación completa

Los RMM pueden utilizarse para la liberación de productos si han sido sometidos a una validación primaria por parte del fabricante [8]. Hay que tener en cuenta que, según la USP, la prueba en placa se sigue utilizando como método de referencia en caso de disputa. [7]. Tras la validación primaria, el usuario debe realizar pruebas de *idoneidad* y de *equivalencia*. [8]. La prueba de idoneidad garantiza que las propiedades del producto, por ejemplo, el bajo contenido de sales en el caso de WFI, no influyen negativamente en la calidad de la medición. En el transcurso de la prueba de equivalencia, el método de la farmacopea (prueba en placa) y el nuevo método (RMM) se comparan directamente entre sí para comprobar si son estadísticamente iguales. Para ello, se pueden utilizar los datos de la validación primaria y comparar los parámetros estadísticos y/o aplicar ambos métodos simultáneamente a muestras reales. [8]. Aunque la Farmacopea Europea describe la prueba de equivalencia, según los expertos, una *prueba unilateral de no inferioridad* parece ser más útil para la validación de los RMM. [9]. Esto también tiene en cuenta la posibilidad de que el RMM sea superior al método de la farmacopea, ya que, por ejemplo, un método no basado en el crecimiento puede detectar más células de las que se cuentan en una placa de agar. Por último, a partir de los datos obtenidos mediante el estudio, el usuario debe proponer y aplicar nuevos límites en la unidad de RMM para liberar el producto o el agua [7] [2]. Después de realizar las pruebas adecuadas, un RMM podría controlar de forma continua o manual uno o varios puntos de muestreo y la liberación del agua puede realizarse en tiempo real.

### 4.2. RMM como control adicional

Como alternativa al ejemplo anterior, los RMMs puede utilizarse como monitorización adicional para garantizar un control microbiológico completo del sistema de agua ultrapura. Ya se han publicado dos ejemplos en los que los usuarios pudieron detectar un cambio microbiológico en el proceso con la información adicional que proporciona la monitorización continua. [10] [11]. En ambos casos, esto sólo pudo determinarse retrospectivamente sobre la base de otros datos y corregirse posteriormente. Esto demuestra que la supervisión continua con RMM tiene ventajas definitivas en áreas críticas, ya que los problemas pueden detectarse antes y corregirse inmediatamente. Sin embargo, aparte de la supervisión continua de una planta, existen otras posibilidades muy interesantes de utilizar la RMM que son muy relevantes por sus efectos.

### **4.3. Evaluación de los PNT y los modos de funcionamiento por parte de RMM**

Los PNT son instrucciones que especifican la secuencia exacta de las operaciones y su documentación. Los PNT se crean para que el trabajo pueda llevarse a cabo de forma clara. Esto aumenta la seguridad y los resultados pueden evaluarse con claridad. En las empresas farmacéuticas existen PNT para el muestreo manual de muestras microbiológicas descrito anteriormente. En la mayoría de los casos, éstos incluyen un paso de limpieza y enjuague del lugar de muestreo para evitar la contaminación de la muestra por células adheridas al lugar de muestreo. Esto garantiza que la muestra refleje el estado del agua dentro de la planta y no el estado del punto de muestreo. Las operaciones de mantenimiento y limpieza también se definen en los PNT.

#### **4.3.1. Evaluación del PNT para el muestreo**

Durante el funcionamiento de una planta de pruebas, se observó un aumento del número de células intactas medido con un citómetro de flujo en el transcurso de cuatro semanas. Se realizó un experimento para responder a la pregunta de si la carga microbiológica de las muestras se debía a la contaminación de los puntos de muestreo o se originaba dentro de la planta. Siguiendo el PNT, se tomó una muestra de cada punto de muestreo y se analizó con el citómetro de flujo. Posteriormente, se flameó cada punto de muestreo y se volvió a realizar el PNT anterior y el muestreo.

Se comprobó que el flameado adicional redujo significativamente el recuento de células intactas en todos los lugares de muestreo. La figura 1 muestra los resultados del citómetro de flujo. La parte izquierda de la figura muestra el resultado antes de flamear el sitio de muestreo y la parte derecha muestra el resultado después de flamear. Los puntos dentro del polígono rojo son bacterias. La figura 2 muestra el resumen de los valores medios de todos los puntos de muestreo. De izquierda a derecha, los resultados corresponden a la muestra después de la ultrafiltración (WFI), después de la electrodesionización (EDI), después de la segunda etapa de la ósmosis inversa (P2), después de la primera etapa de la ósmosis inversa (P1) y el concentrado después de la segunda etapa de la ósmosis inversa (C2). Se observó que el efecto se producía en todos los puntos de muestreo y era inmediatamente reconocible mediante el uso de RMM. Esto demostró que el anterior PNT para el muestreo era insuficiente y debía adaptarse en consecuencia. Con el método de la farmacopea, este efecto sólo habría sido detectable después de cinco días.

Especialmente en situaciones en las que la fuente de contaminación no está clara, los RMM tienen una clara ventaja para acelerar la resolución de problemas. Por ejemplo, cuando se detecta una violación del valor límite con el método de la farmacopea y se realiza una medición comparativa con un RMM antes y después de la medida correctiva, se puede evaluar inmediatamente la eficacia de la medida.

Tal y como recomienda el Anexo 1 de las GMPs, el uso de RMM como parte de la CCS permite comprobar la eficacia de los flujos de trabajo con poco gasto de tiempo y, por tanto, mejorarlos continuamente.

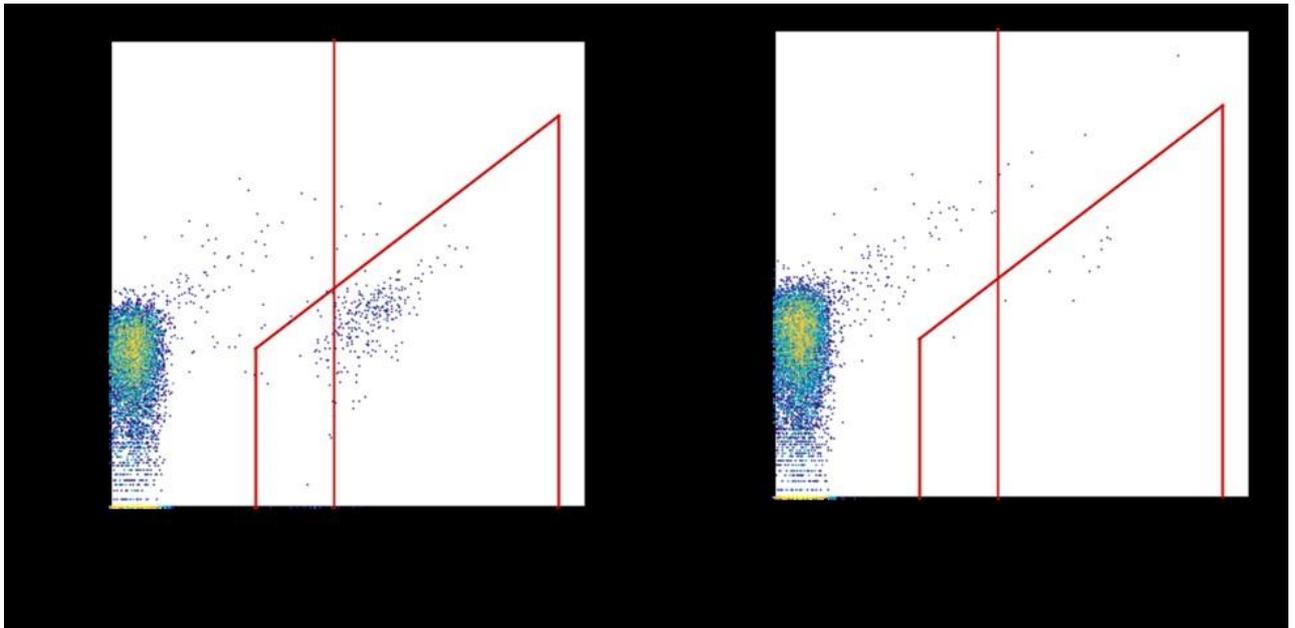


Figura 1: Diagrama de puntos de un citómetro de flujo. Fuente: BWT AQUA AG

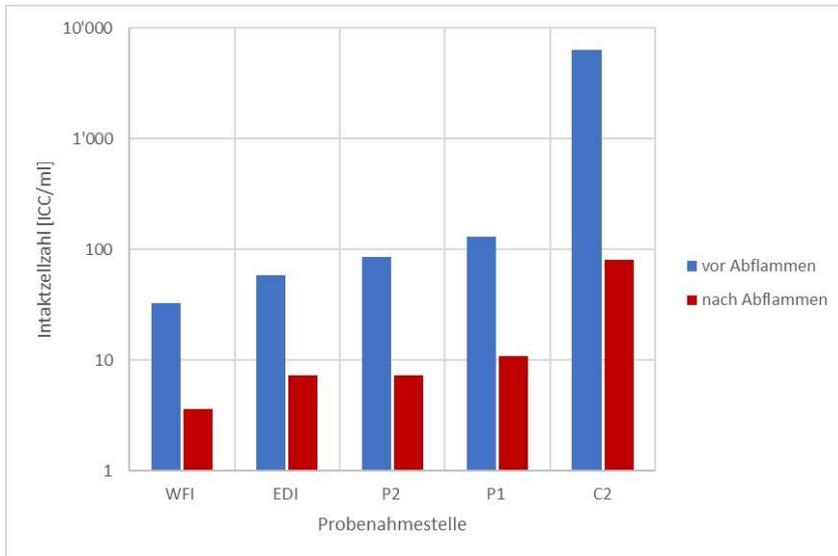


Figura 2: Resultados del citómetro de flujo antes y después de flamear los puntos de muestreo. Fuente: BWT AQUA AG

#### 4.3.2. Evaluación del PNT para el funcionamiento de la planta

El modo de funcionamiento de una planta puede influir en la carga microbiana del agua producida. En el marco de un ensayo, se debatió si la parada y el arranque tras una breve parada pueden influir en la calidad microbiológica del agua producida por un productor. Este procedimiento puede, por ejemplo, determinar cuánto tiempo hay que desechar el agua después de cambiar el modo de funcionamiento y se puede optimizar la cantidad de desechos al mínimo y ahorrar recursos.

Para llevar a cabo la prueba, la planta generadora funcionó de forma continua y se tomaron muestras manuales en todos los puntos de muestreo. Tras el muestreo, se detuvo la planta. Después de 30 minutos, se reinició la planta y, tras un breve enjuague previo, se tomó una segunda muestra en todos los puntos de muestreo. Las muestras se midieron manualmente con un citómetro de flujo por triplicado. La figura 3 muestra los valores medios de las muestras antes y después de la parada. De izquierda a derecha, los resultados corresponden a la muestra después de la ultrafiltración (WFI), después de la electrodesionización (EDI), después de la segunda etapa de ósmosis inversa (P2), después de la primera etapa de ósmosis inversa (P1), del concentrado después de la segunda etapa

de ósmosis inversa (C2), antes de la segunda etapa de ósmosis inversa (MW2), antes de la primera etapa de ósmosis inversa (MW1) y del concentrado después de la primera etapa de ósmosis inversa (C1). Se observa que los valores medidos antes de la parada de la planta son más bajos en todos los puntos de muestreo que después del reinicio de la planta. Se puede suponer que el reinicio del generador provocó el desprendimiento de células de las membranas y de las tuberías debido a las fuerzas de cizallamiento del desbordamiento, y que estas células se encuentran posteriormente en las muestras. Además, de los resultados se puede concluir que también había una biopelícula en el lado "limpio" del generador (después de las membranas de ósmosis inversa).

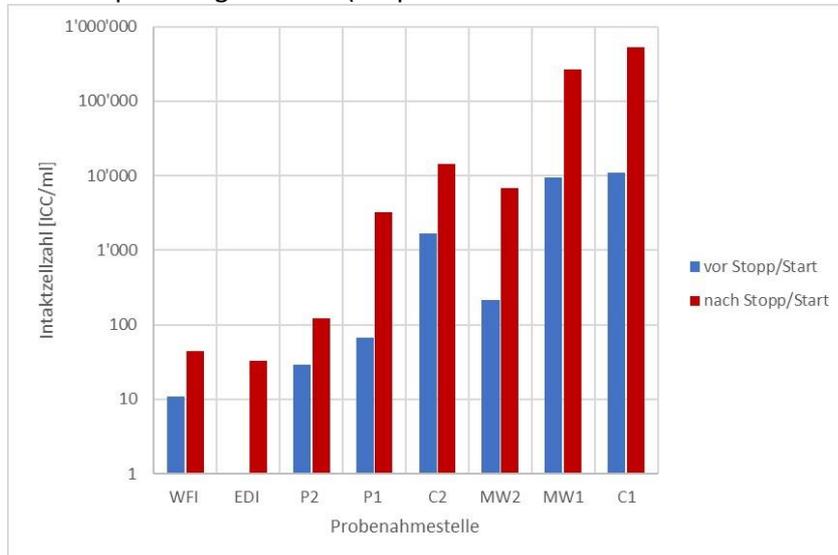


Figura 3: Resultados de un citómetro de flujo del experimento de parada y arranque. Fuente: BWT AQUA AG

En general, se puede suponer que las bacterias están presentes en las tuberías y también en las membranas de una planta. El término VBNC (*viable-pero-no-cultivable*) se ha extendido en los últimos años en el curso de la discusión sobre RMM. Describe el fenómeno de que se pueden detectar células con métodos no basados en el crecimiento en muestras que se considerarían libres de células si se determinaran con el método de la farmacopea. [12] [13]. Precisamente con este conocimiento de fondo tiene sentido el uso de la RMM para comprender y optimizar específicamente los modos de funcionamiento.

#### 4.3.3. Evaluación del PNT sobre la higienización

Como se muestra en un artículo anterior, el RMM puede utilizarse para evaluar el efecto de la sanitización de una planta basada en membranas [14]. En el experimento mencionado, se monitorizó continuamente un punto de medición. En el experimento descrito aquí, se tomaron muestras manuales antes y después de la higienización con agua caliente en todos los puntos de medición de

la planta y se midieron por triplicado. Los valores medios de los resultados del RMM se muestran en

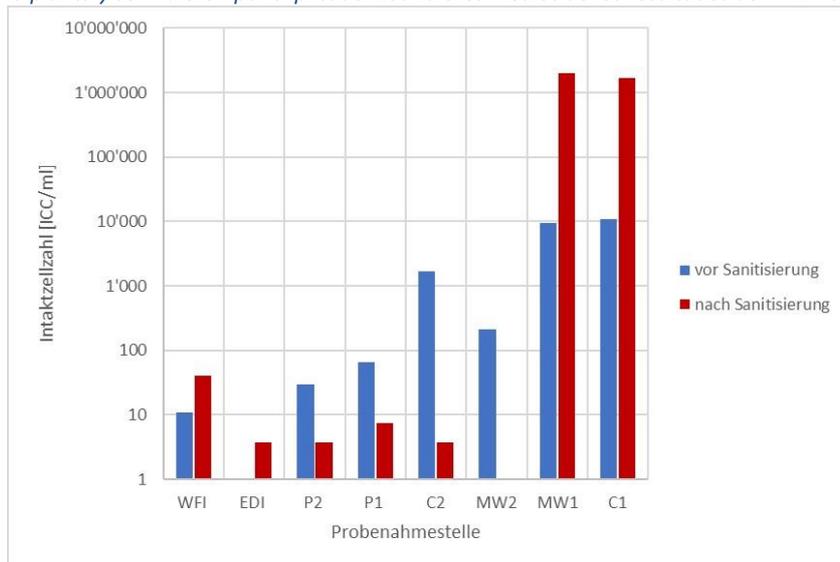


Figura 4 De izquierda a derecha, los resultados corresponden a la muestra después de la ultrafiltración (WFI), después de la electrodesionización (EDI), después de la segunda etapa de ósmosis inversa (P2), después de la primera etapa de ósmosis inversa (P1), del concentrado después de la segunda etapa de ósmosis inversa (C2), antes de la segunda etapa de ósmosis inversa (MW2), antes de la primera etapa de ósmosis inversa (MW1) y del concentrado después de la primera etapa de ósmosis inversa (C1). Se puede observar que los puntos de medición P1, P2, C2 y MW2 muestran una clara reducción del recuento de células intactas tras la higienización. En cambio, en los puntos de medición WFI, EDI, MW1 y C1 se observa un aumento del número de células intactas.

Esta prueba demostró que la higienización era suficiente en el lado de la membrana (en la zona de ósmosis inversa). Los puntos de medición WFI y EDI no estaban completamente desinfectados. Dado que estos dos puntos de medición están más alejados del calentador, cabe suponer que la temperatura allí no se elevó a un grado suficiente para matar todas las células y que el desbordamiento fue posiblemente demasiado bajo. El aumento del número de células intactas en las muestras WFI, EDI, MW1 y C1 se debió probablemente a la expulsión de las células desprendidas por la higienización y no eliminadas por completo. También en este caso, la teoría del VBNC ofrece un enfoque explicativo.

Gracias a este ensayo, se pudo controlar y evaluar el proceso de higienización con agua caliente en toda la planta cerca del evento. Los resultados sugieren que el sistema no estaba ajustado de forma óptima y que el ensayo debería repetirse con parámetros de higienización ajustados. Cabe mencionar una vez más en este contexto que se trata de resultados de una planta experimental y que no cumplen las normas de fabricación de un productor comercial de WFI desde el punto de vista técnico y microbiológico.

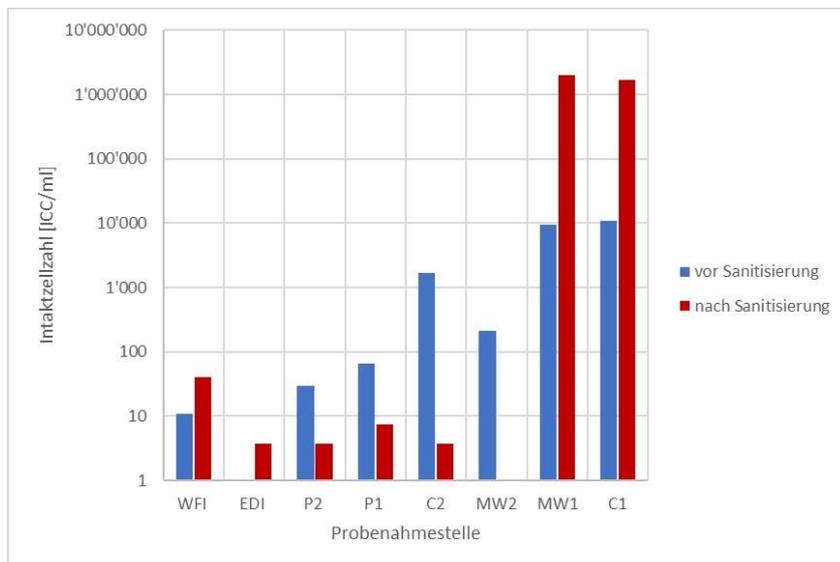


Figura 4 : Resultados de un citómetro de flujo de la prueba de higienización. Fuente: BWT AQUA AG

El Anexo 1 de las GMP exige en el punto 6.12 que el agua sea analizada microbiológicamente después de la regeneración o desinfección (y por lo tanto también después de la sanitización) antes de que se considere la posibilidad de certificar o revocar las bacterias producidas con ella. [2]. Después de los trabajos de mantenimiento y reconstrucción, la norma es realizar pruebas microbiológicas antes de liberar el agua. Con el uso de RMM, los lotes pueden ser liberados hasta cinco días antes en estos casos. Esto no sólo supone un importante ahorro de tiempo, sino que también simplifica la planificación de estos trabajos y pasos de limpieza, ya que el impacto en la producción puede reducirse al mínimo.

## 5. Conclusión

El nuevo Anexo 1 de las GMP hace hincapié en el control de la contaminación. La eficacia del control de la contaminación debe revisarse periódicamente y para ello se deben considerar y revisar los RMM validados para su aplicabilidad [2]. Los resultados presentados aquí demuestran que el uso de RMM validados abre nuevas posibilidades para el seguimiento y la reevaluación de los flujos de procesos, las operaciones y los procedimientos de trabajo.

Donde antes era necesario esperar cinco días para obtener resultados microbiológicos, los RMM vvalidados pueden ahora proporcionar valores reales medidos a corto plazo y cerca del evento. Al detectar el VBNC, también ofrecen la posibilidad de mejorar el proceso y controlar anticipadamente la contaminación en los casos en que el método de la farmacopea sólo podía detectar muy pocas células o ninguna. Esto no sólo puede aumentar la seguridad del producto, sino también optimizar operaciones como el descarte y la higienización de las instalaciones del productor.

## 6. Bibliografía

- [1] . M. E. J. Bartram, J. Cotruvo y A. G. C. Fricker, "Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety", IWA Publishing, Londres, 2003.
- [2] E. Comisión, "Anexo 1" 2022. [En línea]. Disponible: [https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/20220825\\_gmp-an1\\_en\\_0.pdf](https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/20220825_gmp-an1_en_0.pdf).
- [3] Comisión Europea de Farmacopea , "AGUA PARA INYECCIONES", en *Farmacopea Europea 10.0*, 01/2017:0169.

- [4] Comisión Europea de Farmacopea, "AGUA PURIFICADA", en *Europen Pharmacopoeia 10.0*, 04/2018:0008.
- [5] A. Cundell, O. Gordon, N. Haycocks, J. Johnston, M. Luebke, N. Lewis, J. Mateffy y J. W. Weber, "Novel Concept for Online Water Bioburden Analysis: Key Considerations, Applications, and Business Benefits for Microbiological Risk Reduction", *American Pharmaceutical Review*, 2 de julio de 2013.
- [6] L. Jiménez, "Analysis of FDA Enforcement Reports (2012-2019) to Determine the Microbial Diversity in Contaminated Non-Sterile and Sterile Drugs", *American Pharmaceutical Review*, 24 de octubre de 2019.
- [7] USP, "<1223> VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS", *USP43-NF38*, 2020.
- [8] Comisión de la Farmacopea Europea, "5.1.6. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA", en *Farmacopea Europea 10.0*, 07/2017:50106.
- [9] M. J. Miller, E. R. van den Heuvel und D. Roesti, "The role of statistical analysis in validating rapid microbiological methods", *European Pharmaceutical Review*, 2016.
- [10] L. Plourde-Owobi y F. Thiele, "A technological evaluation for "on-line" pharmaceutical water analysis", *La Vague*, abril de 2021.
- [11] L. Grasso und F. Thiele, "Application of flow cytometry for microbiological monitoring of pharmaceutical grade water", *European Pharmaceutical Review*, 2020.
- [12] N. Cohen, "Rapid Microbial Monitoring", *Pharmaceutical Engineering*, septiembre / octubre de 2018.
- [13] C. Fricker, "Detección de organismos viables pero no cultivables", *Cleanroom Technology*, 30 de marzo de 2016.
- [14] F. Thiele, "Einsatz der Durchflussszytometrie als Schnellmethode zur Überwachung der mikrobiologischen Qualität von Reinstwasser", *Pharmind*, pp. 1542-1549, 2018.