

Primer reporte del desarrollo y validación de un método analítico rápido para el control de Bioburden en agua purificada a través de un enfoque AQbD

Se desarrolló y validó un método analítico rápido por quimioluminiscencia para el control de calidad en rutina de Bioburden en agua purificada y su validación través de un enfoque AQbD. Dicho enfoque permitió desarrollar un método analítico robusto, previamente identificando las fuentes de variabilidad y el diseño de una estrategia capaz de mantenerlas bajo control.

DR. C. QUÍMICAS, JUAN A. MESA
BLACK BELT LEAN-SIX SIGMA, CONSULTOR
SENIOR DEL GRUPO QBD

Lo cual aportó una disminución muy significativa en tiempo de análisis, 2, 5 horas respecto al método tradicional de 6 u 8 días. Es exacto y preciso en el rango de 0-50 ufc/ml lo cual permite cuantificar el nivel de contaminación de manera rápida y fácil. Es específico para la gama de microorganismos que normalmente se encuentran en dicha agua con 1 ufc/ml como límite de detección. El método resultó ser equivalente con el oficial de Farmacopea. Ni el agua ni el caldo de cultivo ejercieron efecto matriz.

Introducción

Aunque el desarrollo y la aplicación de las actuales buenas prácticas de manufactura (siglas en inglés, (cGMP) la contaminación microbiana sigue siendo una de las principales causas de retirada de productos en todo el mundo y una grave amenaza sanitaria para los consumidores. Cuando los microorganismos contaminan los productos farmacéuticos, los métodos estándar son usados para cuantificar, detectar, o identificar el número y tipo de microorganismos presentes. Los métodos estándar se basan en el enriquecimiento, la incubación y el aislamiento de los microorganismos de las muestras de productos o 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.

Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar y aplicar métodos sensibles, precisos, robustos, y que proporcionen resultados en el mínimo tiempo para indicar lo antes posible cualquier problema de contaminación ya sea en productos, materias primas así como

en el propio proceso de fabricación luego de realizar alguna intervención en el mismo.

El objetivo de esta publicación es exponer de manera resumida el desarrollo y la validación de un nuevo método analítico rápido basado en el AQbD (New USP Chapter <1220>) para el QC microbiológico de agua purificada. Actualmente este método es usado en rutina en la industria farmacéutica para el análisis rutinario del bioburden en agua purificada. Se usa como método alternativo al método convencional de Farmacopea que tarda alrededor de 8 días. Este desarrollo analítico tiene además la finalidad de acortar el tiempo de análisis QC para poder liberar la producción lo antes posible. Acortar tiempos de paradas de la planta y así disminuir los costes que esto conlleva. Analizar la calidad del agua en el menor tiempo de todos aquellos productos que dependa de ella.

El fundamento del método está basado en la medición del ATP previamente liberado de las células de los microorganismos contaminantes por la quimioluminiscencia (como señal analítica RLU) que se genera al reaccionar con un enzima de tipo luciferasa.

La validación se realiza siguiendo las pautas de Farmacopea Europea capítulo 5.1.6 "Alternative methods for control of microbiological quality" Adicionalmente como referencia a la monografía de USP <1220>, propuesta como un nuevo Capítulo General "Ciclo de Vida del Procedimiento Analítico" que será consistente con los conceptos de calidad por diseño (QbD), tal como se describe en el P8 (R2) y Q14, *International Council for Harmonization (ICH)*.

Ventajas del Método

El método Permite realizar el control de Bioburden en Agua Purificada en 2,5 h de 5 muestras por duplicado.

Desde la perspectiva de la manufactura, un tiempo más corto para un resultado le permite a la compañía liberar el agua rápidamente, transferir el trabajo en proceso a la siguiente etapa y llevar el producto terminado al mercado, lo cual acorta el ciclo de producción, reduce los requisitos del inventario y libera el capital de trabajo. Este método permite materializar estos beneficios y puede empatar los requerimientos de la línea de manufactura en términos del rendimiento de análisis. Los ahorros significativos de este método rápido también llega a la capacidad para identificar, contener y recuperarse de un evento de contaminación rápidamente. Son obvios los beneficios financieros, los de la cadena de suministros y los de la marca, al ser capaces de poder recuperar productos afectados del mercado y de los centros de distribución antes de que lleguen a los consumidores.

Otras ventajas serían la facilidad de uso, los requisitos mínimos de capacitación, el cumplimiento con las iniciativas de la tecnología analítica de proceso (PAT). La alta especificidad y sensibilidad, la capacidad para interconectarse con los sistemas de manejo de información del laboratorio y la capacidad para analizar la tendencia de los datos. Estas características podrían contribuir potencialmente a un mejor control, calidad y eficiencia en los procesos de manufactura y de liberación de producto.

Desarrollo y validación

Se partió del conocimiento previo y de la literatura disponible para establecer las diferentes etapas del desarrollo analítico, Tabla1 y el enfoque QbD se aprecia en la Figura 1.

Se establece el perfil objetivo analítico (POA), que es similar al concepto de un perfil de calidad de un producto objetivo

TABLA 1: CONDICIONES INICIALES DE TRABAJO

Muestreo
Filtración de microorganismos
Incubación
Extracción del ATP de las células
Volumen de muestra
Desarrollo de la señal analítica

(CPO, ICH P8) y describen los criterios para obtener resultados reportables. Además, se aplicaron conceptos y herramientas de gestión del riesgo de calidad (QRM, por sus siglas en inglés) que van desde ICH Q9 hasta el desarrollo y validación de métodos analíticos. Entre las herramientas aplicadas, está la matriz CNX de y los estudios de diseño de experimentos (DoE, por sus siglas en inglés). Los DoEs se han utilizado para evaluar la influencia en la señal analítica (RLU) y entender los rangos aceptables para estas variables. El procedimiento AQBd y las herramientas de aplicadas en este trabajo se han detallado previamente en: Juan A. Mesa. AQBd, “Nuevo paradigma para el control de la calidad en la industria farmacéutica”: <https://www.farmaindustrial.com/revistas/enero-febrero-2023-2023>.

El agua que se analizó fue la procedente de los diferentes puntos de usos y tienen normalmente un nivel de contaminación de entre 0 a 2 ufc/ml siendo el nivel de alerta a

TABLA 2: FRAGMENTO DE LA MATRIZ CNX

Items	Causas potenciales de fallas	C, N, X	Comentarios
Materiales	<i>Estabilidad del Enzima</i>	X	Existen indicios de que la actividad enzimática se afecte en función del tiempo de uso
Ambiente	<i>Tiempo de incubación</i>	X	El tiempo de incubación se considera crítico para el crecimiento de los microorganismos y la detectabilidad de la señal analítica (RLU) depende de ello
Medición	<i>Volumen de muestra</i>	X	El volumen que se toma de muestra a medir en el equipo puede afectar la señal analítica
Materiales	<i>Lotes de reactivos (enzima)</i>		La variabilidad en los lotes del enzima puede afectar la sensibilidad del valor de RLU
Medición	<i>Tiempo de preparación de la muestra</i>		Tiempo desde que se añade extractante de ATP hasta obtener el valor RLU en el equipo. Se considera un parámetro crítico debido a que una vez liberado el ATP de la célula este comienza a degradarse por oxidación y fotodescomposición, un tiempo difícil de controlar.

partir de 5 ufc/ml. Para cumplir el criterio de desempeño se establece el POA: la capacidad del método de poder diferenciar 0 ufc/ml de 5 ufc/ml (nivel de alerta) y 5 de 50 ufc/ml (Nivel de alarma) (figura 1).

Los posibles modos de fallo (variabilidad en la señal analítica) del método fueron examinados a través de discusiones con los

técnicos experimentados y se construyó un diagrama Ishikawa (Figura 2).

Evaluación de riesgos y espacio de diseño para el método analítico

Las posibles causas de fracaso o variabilidad en la señal analítica (RLU) se evaluaron con un modelo CNX (Tabla 2).

Se identificaron las variables que requirieron ser controladas (C), aquellas que eran ruido (N) y aquellas que requirieron experimentación (X).

La variabilidad aportada por las variables tipo C se controló a través de la validación IOQ, mantenimientos preventivos, políticas de validación y SST antes de comenzar a trabajar con el equipo.

Se llevó a cabo un análisis de efectos y modos de falla (FMEA) utilizando las causas de variabilidad identificadas anteriormente. Se utilizó una escala de 1 a 5 para clasificar la gravedad (S) de la falla, la probabilidad (P) y la detención de la misma (D).

Diseño de experimento (DoE) robusto y Optimización del método

El objetivo fue maximizar la respuesta de los POA y hacerla robusta (maximizar POA con mínima variabilidad), de manera que permita a simple vista diferenciar una muestra blanco (0 ufc/ml) de una muestra contaminada de 5 ufc/ml, nivel de alerta y 50 ufc/ml de 5 ufc/ml

$$POA_1 = \Delta RLU_{promedio (5-0ufc/ml)} = RLU_{promedio \text{ de } 5ufc/ml} - RLU_{0ufc/ml \text{ blanco}}$$

$$POA_2 = \Delta RLU_{promedio (50-5ufc/ml)} = RLU_{promedio \text{ de } 50ufc/ml} - RLU_{5ufc/ml}$$

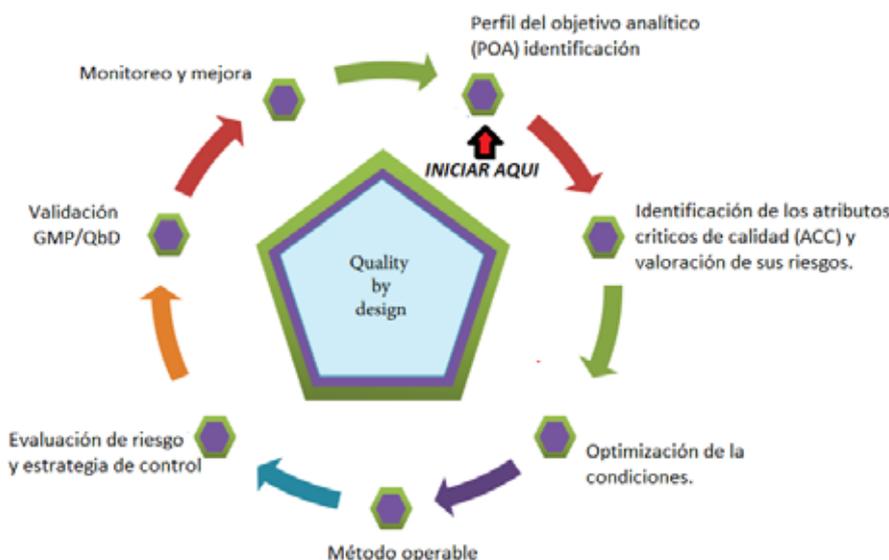


Figura 1 Enfoque QbD.

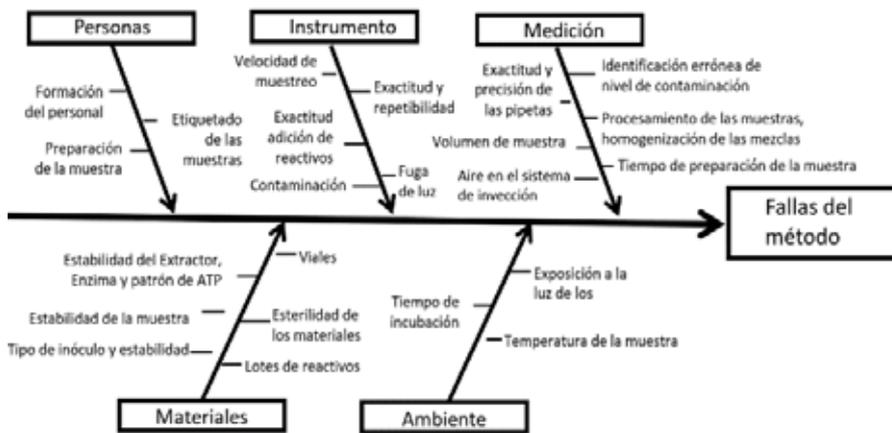


Figura 2. Diagrama Ishikawa, potenciales causas de fallas en el método.

como nivel de alarma por contaminación, ver Cuadro 1. Conocer el proceso analítico, estudiar el efecto de las variables que le afectan y

obtener la información necesaria para la mejorar todo el proceso analítico.

Se utilizó un diseño de experimento 25-2 para investigar la influencia de las variables aquellas que fueron categorizada como de experimentación y ruido en la matriz CNX, además del lote de fabricación del enzima, tiempo de análisis de la muestra y tiempo de reconstitución del enzima fueron analizadas. Fue la estabilidad de la enzima la variable más significativa. Se estudió la estabilidad enzimática a través de una cinética siendo el día 6 de reconstitución el máximo día para trabajar la misma con resultados satisfactorios.

La optimización del método se realizó con un diseño factorial 23. Las variables fueron el tiempo de incubación, volumen de muestra a medir en el equipo y estabilidad del enzima. Con el objetivo de optimizar el aprovechamiento de esta última, se usó en el DoE de

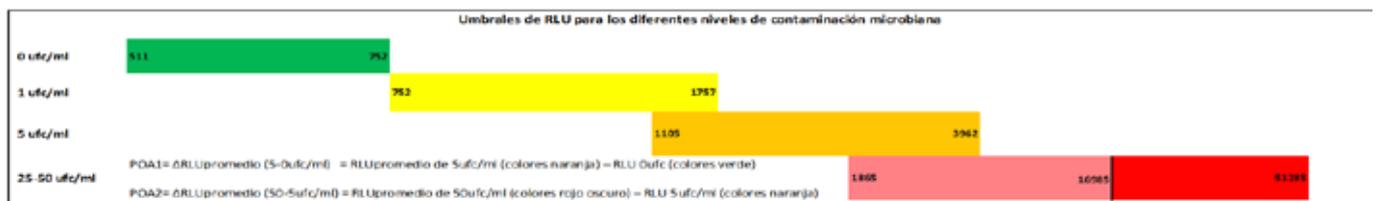


Figura 3. Representación gráfica de los diferentes umbrales de contaminación definidos y programable en el software.

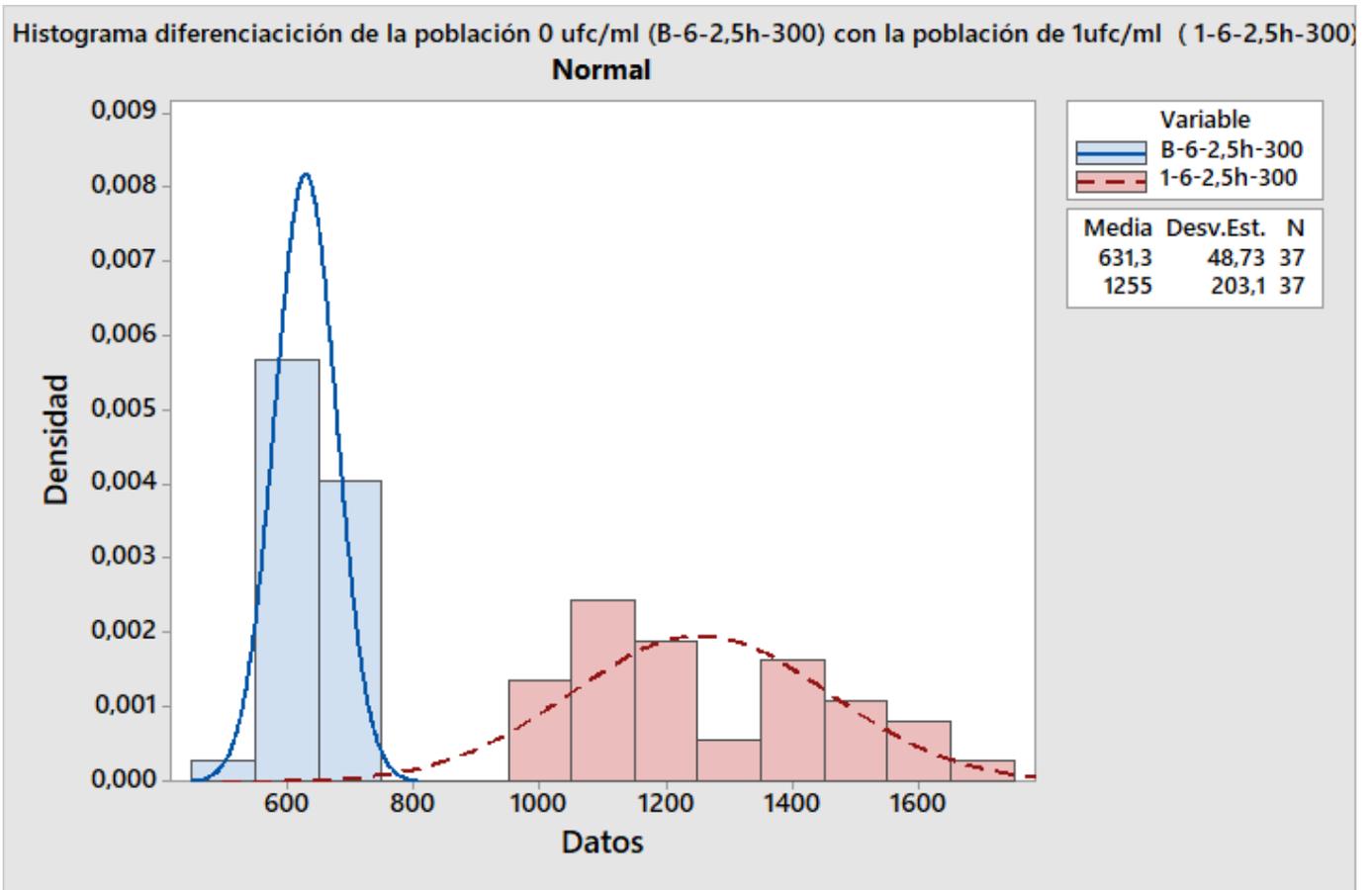


Figura 4. Diferenciación estadística, histogramas de las distribuciones poblacionales de valores de RLU para 0 ufc/ml verde en la Figura 3 con la población de RLU de 1 ufc/ml (amarillo en la Figura 3)

optimización el nivel +1 los 6 días de reconstituida y el nivel -1 la enzima recién reconstituida. Se trabajó con un enfoque Taguchi para analizar la variabilidad de las variables implicadas bajo condiciones de ruidos y se escogieron aquellos valores para hacer la señal analítica más robustas. Como ruido se tuvo en cuenta el tiempo que se tarda en llevar a cabo la lectura en el equipo una vez añadido el reactivo extractante para así tener en cuenta la potencial labilidad del ATP libre por la luz y la oxidación. El experimento fue a dos bloques, un bacht en la mañana y el otro en la tarde del día siguiente para tener en cuenta la variabilidad en las condiciones ambientales. Como resultado del DoE:

Establecieron las condiciones analíticas óptimas y robustas del método.

Con estas condiciones, se cumplió el POA y su demostración experimental quedando así validadas las nuevas condiciones analíticas.

Con las condiciones optimizadas, se establecieron los umbrales de contaminación microbiana, *Figura 3*.

El establecimiento de los umbrales de contaminación permite definir de manera rápida y visible desde la pantalla del ordenador usando códigos de colores o a través de valores numéricos de RLU, el nivel de contaminación. Así, rápidamente se visualiza si una muestra de agua está contaminada y que valor de contaminación presenta en ufc/ml. Permite establecer y validar el POA1 y POA2 (5 y 50 ufc/ml) correspondiente a los niveles de alerta y alarma respectivamente. Estos umbrales son las correspondientes distribuciones poblacionales de valores de RLU (para una n 35-100) de los inóculos de: 0, 1, 5, 25, y 50 ufc/ml previamente preparados. Estos umbrales están definidos por las medias poblacionales y por sus intervalos de confianza para cada nivel de contaminación de los inóculos. Cada valor de RLU usado en los cálculos es la media de 2 mediciones.

La escala de colores de niveles de contaminación: 0, 1, 5, 25, y 50 ufc/ml (ver *Figura 3*) muestra por ejemplo: el inóculo blanco 0 ufc/ml (color verde) su población de valores

de RLU se enmarca entre 511 a 752, así cualquier muestra de 0 ufc/ml su RLU se enmarca en ese intervalo. Para el nivel de alerta, 5 ufc/ml (color naranja) cualquier muestra o inóculo con esta concentración microbiana se encuentra dentro del intervalo poblacional de valores de RLU de 1105 a 3962. El nivel de alerta de 50 ufc/ml (color rojo) se enmarca en el intervalo de confianza para los valores de RLU de 16985 a 51285. Es a partir de valores de RLU > 16985 cuando se toman medidas por alerta de contaminación. Podemos además diferenciar por la escala de colores una muestra de 0 ufc/ml (verde) de 1 ufc/ml (amarillo) intervalos de confianza para la media poblacional va de 752 a 1757 RLU, (*figura 4*) y 25 ufc/ml (rojo claro), *Figura 3*.

Validación del método según farmacopea europea

Los parámetros a validar son:

- *Exactitud y precisión*
- *Especificidad*
- *Límite de detección*

PROSPECTOS FARMACÉUTICOS, COSMÉTICOS, MARKETING Y TODO TIPO DE IMPRESOS



Calidad CERTIFICADA



CONFIE
EN NOSOTROS



- Robustez
- Test de Equivalencia
- Interferencia de la matriz

Método Operable

Resumen del desarrollo del método y sus condiciones analíticas finales o de operación.

Para establecer las condiciones operables se tomaron el estudio de robustez (DoE 23) en las que se determinaron la influencia en la señal analítica de variaciones pequeñas de los siguientes parámetros:

- Δt de incubación (-10 minutos de incubación)
- Lotes de Enzima
- Analista (dos analistas)

Para la robustez se usó un inóculo de 5 ufc/ml (nivel de alerta de contaminación).

Las variables Δt de incubación (-10 minutos de incubación) y Analista (dos analistas) fueron significativas.

Con los resultados del DoE de optimización y del DoE de robustez se establecieron las condiciones Analíticas Operables.

Evaluación de riesgo y control

Estudios posteriores con -5 min en la incubación demostró que no había una variabilidad significativa, pero se estableció un Δt de -2 minutos, más restrictivo para asegurarnos de que la probabilidad de cambios significativos por falta de tiempo o exceso de tiempo de incubación no afectaran los resultados. La formación de los analistas implicados en el método analítico fueron las acciones de mitigación de la potencial variabilidad. El riesgo fue evaluado. Tras las acciones de mitigación estos son de tipología medio o baja. Si resultara algún riesgo alto que no pudiera mitigarse, debería ser reevaluadas las condiciones analíticas y validadas.

Etapas de Monitoreo y Mejora.

Se decidió utilizar el POA1, atributo crítico de calidad para el control del proceso (gráficos de control de proceso). Cuando se detecta una variación de causa especial se puede realizar una investigación para determinar la causa raíz y las acciones correctivas apropiadas. Estas causas pueden estar asociadas al instrumental por desperfectos, desgastes, necesidad de mantenimientos preventivos. Esta etapa permite además establecer con exactitud el momento de llevar a cabo mantenimiento. Las caducidades de reactivos, cambios en el proceso de fabrica-

ción, reactivos (Enzima y Extractor) así como si existe alguna variabilidad significativa asociada con el propio analista de laboratorio.

Conclusiones

Se logró cumplir los POA1 y POA2 y establecer los criterios de calidad para evaluar el agua en la planta.

El método desarrollado y validado permite analizar 5 muestras por duplicado a la vez. Presenta la capacidad de poder cuantificar de manera sencilla y visual, el nivel de contaminación de 5 muestras problemas por duplicadas desde 0 ufc/ml hasta 50 ufc/ml en 2,5 horas., Figura 3. El método actualmente se aplica en rutina en la industria para el análisis de control de la calidad microbiológico rápido del agua de proceso. Se utiliza para evitar potenciales paradas prolongadas de la planta de producción por incidencias o intervenciones. Permite liberar la producción más rápidamente, lo cual disminuye significativamente el coste.

La detección temprana de una contaminación microbiana de 5 ufc/ml permite minimizar pérdidas en producción, reducir el tiempo de prueba, aumentar el rendimiento con un lanzamiento más rápido del producto y optimizar además el control de los procesos.

El enfoque QbD permite la aplicación de herramientas de calidad como el Diagrama de Ishikawa (Figura 2), matriz CNX, FMEA y matrices de trazabilidad, DoEs y gráficos de control de procesos. Todas estas herramientas permitieron la identificación, clasificación, evaluación y optimización de todos aquellos parámetros significativos que pueden afectar la señal analítica (RLU) y el valor POA.

Se optimizó la cantidad de reactivos, el tiempo de uso (caducidad) y la variación entre diferentes lotes minimizando su efecto con un diseño experimental robusto. Se analizó además la estabilidad de la Enzima.

El DoE y Taguchi DoE arrojaron información valiosa sobre la influencia de cada parámetro significativo y se encontró la combinación perfecta para maximizar el valor del POA con una variación mínima de la señal analítica (RLU). Contribuyeron a comprender las fuentes de variabilidad en el rendimiento del método.

La comprensión del impacto de dichas fuentes de variabilidad en el rendimiento del método, fueron analizadas a través de la evaluación del riesgo y mitigadas su impacto en el resultado final.

Se realizó la validación siguiendo las pautas de Farmacopea Europea capítulo 5.1.6 donde

se evaluaron los siguientes parámetros: Exactitud y precisión, Especificidad, Límite de detección, Robustez, Test de Equivalencia e Interferencia de la matriz.

El método es exacto y preciso en el rango de 0-50 ufc/ml y permite cuantificar de manera rápida y fácil en este rango de contaminación.

Es específico para una gama amplia de microorganismos que normalmente el cliente tiene presente en sus diferentes puntos de usos de agua a la que controla su calidad. Se además usaron cepas salvajes para este fin.

El método tiene un límite de detección de 1 ufc/ml (Figura 4) por debajo de 5 ufc/ml que es la alerta de contaminación establecida por el cliente.

El método es robusto frente a cambios de tiempo de incubación, por si hay errores en la medición del tiempo de incubación establecido. A tiempos menores a 10 minutos, el método da resultados satisfactorios. Sin embargo, se decidió usar ± 2 minutos para evitar potenciales problemas.

El método desarrollado es equivalente al oficial de Farmacopea (Test de equivalencia), al coincidir la cantidad de UFC detectada respecto a la recobrada con el método tradicional que usa el cliente.

No existen interferencias de la matriz ya que el agua, así como el caldo de cultivo se conocen bien sus respectivas composiciones químicas a través de controles de calidad. Los mismos no presentan concomitante que ejerzan efecto "quenching" de la señal analítica. Además, no se detectó ese efecto durante el desarrollo analítico ●

Bibliografía

- Analytical Procedure Life Cycle - New USP Chapter <1220> published. Analytical Quality Control News 13/10/2021. https://www.analytical-quality-control-group.org/news_9208.html
- EMA/CHMP/ICH/195040/2022. Comité de Medicamentos de Uso Humano. 31 Marzo 2022 (Draft).
- Brian Glass, Pharmatech Associates. ICH & USP <1220>: Implementing A QbD Analytical Framework. Bioprocess Online, Feb 9, 2022.
- Farmacopea Europea Capítulo 5.1.6 Alternative methods for control of microbiological quality.
- Farmacopea Europea Capítulo 2.6.12 Recuento en Formas Farmacéuticas No Estéres.
- Farmacopea Europea Capítulo 2.6.13 Ausencia de Microorganismos específicos.
- Evaluation, Validation, and Implementation of New Microbiological Testing Methods. Técnica
- Report No. 33. PDA May/June 2000. Vol.54.

Nota: En todos los experimentos realizados en este desarrollo y validación se usaron inóculos mixtos para simular las condiciones reales. Se usaron cepas salvajes aisladas de la propia agua de proceso y también se usaron cepa de referencia ATCC y sus mezclas con las salvajes.

Más de 30 años cuidando del aire que respiras

Garantizamos fiabilidad en los procesos de la industria farmacéutica

Bienvenidos a Venfilter, empresa que desde 1992 diseña, fabrica y comercializa filtros de aire destinados a la protección del medio ambiente, los procesos de fabricación y las personas.



Contacta con nuestros expertos

937 862 607



Filtros de alta calidad

Los controles de calidad son imprescindibles para garantizar el buen rendimiento de nuestros filtros, que son sometidos a un test individual en cada ocasión.



Sostenibilidad

Ante un mundo cada vez más contaminado, somos conscientes de que la filtración de aire juega un papel fundamental en la protección de equipamientos y personas.



Eurovent

Desde mayo de 2013, Venfilter es la única empresa nacional que forma parte de Eurovent 'AirFilters'.



Nuestros valores

Nuestro motor es la pasión por lo que hacemos. Ética y transparencia e innovación, cumplimiento de las normativas y máximas garantías para nuestros clientes.



I + D

Disponemos del único laboratorio en España que nos permite garantizar nuestros estándares para filtros según norma EN1822 y un banco de pruebas que nos permite garantizar la norma EN 16890.

