

# **Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso**

*ALEJANDRA CORTÉS, CECILIA SANDINO, JANETH ARIAS*

*Empresa Colombiana de Productos Veterinarios Vecol S.A. Pontificia Universidad Javeriana  
Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias  
Carrera 7 No. 43 – 82 Edificio Felix Restrepo oficina 111 Santafé de Bogotá  
Cooresponding autor: jdcarias@javeriana.edu.co*

## **RESUMEN**

El objetivo principal de validar una técnica de análisis, consiste en obtener evidencia documentada que permita confirmar que los resultados obtenidos son confiables y reproducibles. En el presente trabajo se busca validar la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso, y optimizar la técnica de filtración por membrana para éstas vacunas, esto permite, al capacitar el personal requerido y estandarizar las partes del proceso, obtener los resultados esperados y reducir las probabilidades de reanálisis. Este trabajo se basó en las normas propuestas por entidades regulatorias como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Código Federal de Regulaciones (CFR), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXIV), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), quienes a nivel mundial establecen los parámetros necesarios para obtener productos de alta calidad. Para llevar a cabo la validación, se hizo una revisión de todos los factores que influyen en la prueba, incluyendo, las técnicas, los equipos, el personal y las instalaciones. Se realizaron pruebas preliminares, en las cuales se evaluó la calidad de los medios de cultivo y que la actividad bacteriostática y fungistática de la vacuna no afectara adversamente la veracidad de la prueba. Por último, se procedió a la realización de la prueba de esterilidad, con la cual se buscó determinar la ausencia o presencia de contaminantes en el producto, por medio de las técnicas de inoculación directa y filtración por membrana.

Basados en los resultados de éste trabajo, se encontró que el método de filtración por membrana es más confiable y sólido que el método de inoculación directa.

## **ABSTRACT**

The main objective of validation of analytical procedures is to procure documented evidence that allows to confirm that the obtained results are reliable and reproducible. This project seeks the validation of sterility test for oil and aqueous vehicles viral vaccines and the optimization of the membrane filtration method for these type of test. The standardization of the process and the training and qualification of required personnel allows the obtention of more reliable results and decreases the risks reanalysis. This work is based on the proposed norms of the regulatory entities as the World Health Organization (WHO), the Code Federal of Regulations (CFR), the United States Pharmacopoeia (XXIV USP), the Office International des Epizooties (OIE), that permit to establish in a world wide range the necessary parameters to obtain high quality products. For this project, it was done a checking of all the factors that influence the validity of the test, including the techniques, equipment, personnel and laboratory facilities. In the preliminary tests it was evaluated the quality of culture media and the bacteriostatic and fungistatic activity of the vaccine and their influence or adverse effect on the reliability of the test. Finally, it was proceeded with to the sterility test, to determine the absence or presence of microbial contamination in the product, comparing the direct transfer and the membrane filtration methods.

Based on the results of the present work we found the membrane filtration method is more reliable and solid than the direct transfer method

## **PALABRAS CLAVE**

Esterilidad, vacuna viral oleosa, vacuna viral acuosa, validación.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a los directivos de la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios por el préstamo de sus instalaciones y a todo el equipo interdisciplinario que con su trabajo y apoyo contribuyó a la realización del proyecto.

## **INTRODUCCION**

Los productos biológicos se distinguen de otras sustancias farmacéuticas en que se obtienen a partir de organismos vivos o productos de estos, ya sean microorganismos normales o genéticamente modificados, y que con frecuencia tienen una estructura molecular compleja. Es preciso dar especial consideración a la calidad de este tipo de productos, debido a la naturaleza biológica de la materia prima, tanto en el proceso de fabricación como en los ensayos necesarios para caracterizar los lotes de producto.

En los últimos años los avances en la esfera de los productos biológicos se han sucedido con suma rapidez, y el valor potencial de esos productos en la mejora de la atención de salud a escala mundial es extraordinario. Hay una necesidad imperiosa de que los adelantos tecnológicos vayan acompañados de mecanismos apropiados para velar por la inocuidad, la calidad y la eficacia de los productos.

Las vacunas por ser productos biológicos, aplicables a la prevención, tratamiento o curación de enfermedades, están regidas por unas normas de calidad para su producción, dichas normas están establecidas por entidades como, la Organización Mundial de la Salud (OMS), United States Pharmacopeia (USP) y el Código de Regulaciones Federales (CFR), en los cuales se plantean las metodologías establecidas para el control de calidad de estos productos.

El control de calidad esta dividido en control biológico a partir de bioensayos, control físico-químico y control microbiológico, este último difiere dependiendo del tipo de producto.

Las pruebas de esterilidad son procedimientos que hacen parte del control de calidad microbiológico en manufactura y sirven para demostrar que el producto es estéril, determinando la ausencia o presencia de microorganismos contaminantes en este. OMS. 530(1983).

Para realizar esta prueba se emplean diferentes medios de cultivo, entre los cuales están el Medio Fluido de tioglicolato de Sodio y el Medio Hidrolizado de Soya y Caseína, aunque también se pueden utilizar otros medios con propiedades nutritivas al menos equivalentes.

Principalmente existen dos metodologías para evaluar esterilidad, la primera es la inoculación directa, que consiste en tomar una muestra y pasarla directamente a los medios de prueba, la segunda es la filtración por membrana, la cual es usada para líquidos que al ser muestreados por transferencia directa no dan la cantidad de volumen adecuado para garantizar la veracidad de la prueba y consiste en hacer pasar por medio de vacío a través de una membrana una cantidad apropiada del producto a evaluar y luego de la filtración, la membrana se lava con el diluyente apropiado, se corta y siembra en los medios de prueba. USP XXIV(2000)

La validación de una técnica es el proceso por el cual se establecen mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño del método analítico cumplen los requerimientos para la aplicación analítica propuesta USP XXIV, 2000, siendo su principal objetivo confirmar y documentar que los resultados producidos son confiables.

Por medio de la validación se establecen los parámetros estándares para el método, tales como sensibilidad, especificidad, rata de aislamiento y parámetros de diagnóstico, como título de interés o significancia etc. La validación envuelve un número de actividades y cantidad de datos, con un análisis subsecuente de los datos usando una estadística apropiada. La validación incluye: Estudio del campo, Comparación con otros métodos, comparación con estándares de referencia, estudios colaborativos con otros laboratorios usando el mismo método o procedimiento, Reproducción de datos a partir de una método estándar aceptado, o de una publicación reputable, estudios experimentales. OIE 2000.

Basándose en la necesidad de obtener productos de óptima calidad que cumplan con todas las normas establecidas y la importancia de manejar los parámetros que están involucrados dentro de las técnicas de análisis de productos biológicos se ha desarrollado el presente proyecto que busca validar la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso.

## **METODOLOGÍA**

### **ACTIVIDADES PREVIAS**

Se debe hacer una revisión de todos los factores que influyen en la validez de la prueba, incluye:

a. Las técnicas empleadas deben estar acordes y actualizadas con las exigencias de entidades gubernamentales encargadas de la seguridad de los productos.

b. Los equipos deben encontrarse dentro del programa preventivo y correctivo de la empresa, de

no ser así, deben incluirse dentro de este, además deben estar calibrados y calificados.

**c.** El personal debe estar calificado y con experiencia en el control de productos biológicos y en especial en el desarrollo de la técnica.

**d.** Las instalaciones deben estar ubicadas, construidas y mantenidas de tal forma que sean apropiadas para las operaciones que se realizarán en ellas.

Se procede a realizar las pruebas preliminares, las cuales son el control de calidad de medios y la validación de bacteriostasis y fungistasis.

### PRUEBAS PRELIMINARES

**Control de calidad de medios de cultivo:** Los medios de cultivo son analizados en cuanto a características organolépticas, pH, esterilidad y promoción de crecimiento, se espera que el medio cumpla con las características estipuladas por las casas comerciales y además que tenga la habilidad de soportar crecimiento en ausencia del material de prueba con una cantidad de organismos viables entre 10 -100 UFC que es lo sugerido por la American Type Culture Collection (ATCC) OIE.2000, para esto, se prepara una suspensión que contenga entre 10-100 UFC y se inocula en los medios de cultivo, luego se lleva a incubar como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1. Microorganismos utilizables para las pruebas de promoción de crecimiento y validación de bacteriostasis y fungistasis**

Medio	Microorganismo	Cepa	T.I por 5 días	Condiciones
Tioglicolato de Sodio	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	30 °C— 35 °C	Aeróbicas
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027		
	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 11437		
Tripticasa de Soya	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	20 °C— 25 °C	Aeróbicas
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231		
	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404		

T I : Temperatura de Incubación

USP XXIV. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Sterility Test. Capitulo 7. Rockville M.A: p. 1818-1819.

**Validación de bacteriostasis y fungistasis:** En esta prueba se busca asegurar que la actividad bacteriostática y fungistática del producto no afecta adversamente la veracidad de la prueba; además conocer la cantidad de medio de cultivo requerido en la prueba de esterilidad por inoculación directa y la cantidad de lavados para la técnica de filtración por membrana.

Existen dos métodos para la validación, el método I se refiere a la validación utilizando la filtración por membrana y el método II a la validación utilizando la inoculación directa.

### Método I

- Hacer el pool del producto a probar y su respectivo tratamiento. Ver prueba de esterilidad
- Filtrar la cantidad de producto de prueba. Ver Prueba de esterilidad
- Lavar dos veces la membrana de filtración con 100 ml del diluyente apropiado. Diluyente “A” para producto de tipo acuoso, diluyente “D” para producto de tipo oleoso.
- Hacer una tercera lavada con 100 ml del diluyente que contenga una cantidad de organismos viables entre 10-100
- Repetir el proceso de filtración como control positivo para el diluyente, (dos lavadas con diluyente puro y una con diluyente contaminado), en otra membrana de filtración que no ha sido expuesta al microorganismo empleado en la prueba.
- Tomar las membranas con las pinzas, en condiciones estériles, sembrarlas en el medio apropiado para el microorganismo y llevarlas a incubar. Ver Tabla 1.

### Método II

- Hacer el pool del producto a probar y su respectivo tratamiento. Ver prueba de esterilidad.
- Inocular los medios de cultivo (Caldo Tioglicolato y Caldo Casoy, dos frascos de cada uno) utilizados en la prueba con una suspensión que contenga entre 10-100 UFC.
- En uno de los dos frascos que contienen medio de cultivo, inocular la cantidad de producto apropiada en la proporción indicada 1:10, igual que en la prueba de esterilidad. Ver Prueba de esterilidad.
- El otro frasco con medio de cultivo contaminado con una suspensión que contenga entre 10-100 UFC es el control positivo.
- Llevar a incubar durante 7 días. Ver Tabla 1.

En ambos métodos se evalúan los resultados por similitud o diferencia entre la turbidez (crecimiento microbiano) de la muestra del producto y la del control positivo, las cuales deben ser similares. De no ser así, se aumentan las lavadas en la filtración por membrana (Hasta 5 con 500ml de diluyente) y la cantidad de medio en inoculación directa (Hasta 2L).

Al verificar que los medios de cultivo cumplen con los parámetros de calidad establecidos y que el producto no afecta adversamente la veracidad de la prueba se procede a realizar la prueba de esterilidad

### PRUEBA DE ESTERILIDAD

#### Inoculación directa

#### Vacunas virales oleosas

- Hacer control microbiológico del aire de la cabina.

- Limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina ( Medios de cultivo, muestras).
- Destapar los frascos de muestra y hacer el pool de vacuna (1L) y agitar.
- Alicuotar 300 ml en frascos de 100 ml.
- Contaminar dos de los frascos con una suspensión entre 10-100 UFC.
- Agitar por 20 min en Shaker.
- Agregar tween 80 al 20%, en proporción 1:4 y agitar por 20 min en Shaker hasta que rompa la emulsión de la vacuna.
- Agregar 4 ml de vacuna a cada uno de los frascos con medio dispuestos para la recuperación de bacterias y hongos, además sembrar 4 mL de vacuna contaminada, una con *S. aureus* y otra con *C. albicans* como controles.
- Llevar a incubar por 14 días (USP XXIV): Medio Tioglicolato de Sodio a 30 °C - 35°C y Medio Trypticosa Soya a 20 °C - 25°C.
- Aceptar el lote y reportar la prueba como **SATISFACTORIA**, si no hay evidencia de crecimiento microbiano en los medios de cultivo, al evidenciar crecimiento: Realizar coloración de Gram y repetir la prueba.
- Reportar la prueba como **NO SATISFACTORIA**, si la segunda prueba evidencia nuevamente crecimiento microbiano en los medios.

#### **Vacunas virales acuosas**

- Hacer control microbiológico del aire de la cabina.
- Limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina ( Medios de cultivo, muestras).
- Reconstituir los viales de muestra, hacer el pool de vacuna (1 L) y agitar.
- Alicuotar 300 ml en frascos de 100 ml.
- Contaminar dos de los frascos con una suspensión entre 10-100 UFC.
- Agitar los frascos por 10 min en Shaker.
- Agregar 4 ml de vacuna a cada uno de los frascos con medio dispuestos para la recuperación de bacterias y hongos, además sembrar 4 mL de vacuna contaminada, una con *S. aureus* y otra con *C. albicans* como controles.
- Llevar a incubar por 14 días (USP XXIV): Medio Tioglicolato de Sodio a 30 °C - 35°C y Medio Trypticosa Soya a 20 °C - 25°C.
- Aceptar el lote y reportar la prueba como **SATISFACTORIA**, si no hay evidencia de crecimiento microbiano en los medios de cultivo. Al evidenciar crecimiento: Realizar coloración de Gram y repetir la prueba.
- Reportar la prueba como **NO SATISFACTORIA**,

si la segunda prueba evidencia nuevamente crecimiento microbiano en los medios.

#### **Filtración por membrana**

##### **Vacunas virales oleosas**

- Hacer control microbiológico del aire de la cabina.
- Limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina ( Medios de cultivo, Manifold, muestras).
- Destapar los frascos de muestra, hacer el pool de vacuna ( 1L) y agitar.
- Alicuotar 300 ml en frascos de 100 ml.
- Contaminar dos de los frascos con una suspensión entre 10-100 UFC
- Agregar tween 80 al 20%, en proporción 1:4 y agitar por 20 min en Shaker hasta que rompa la emulsión de la vacuna.
- Filtrar 100 mL de muestra, con ayuda de una bomba de vacío, en cabina de flujo laminar
- Lavar tres veces con 100 ml de diluyente «D»
- Tomar la membrana con pinzas estériles
- Cortar la membrana en partes iguales y adicionar la mitad en cada uno de los medios de recuperación microbiana, Tioglicolato de Sodio y Trypticosa de soya
- Hacer una filtración utilizando diluyente “D” como control de esterilidad de este.
- Hacer dos filtraciones utilizando una muestra de vacuna contaminada con *S. aureus* y otra con *C. albicans* y sembrar por mitades independientemente en los medios Tioglicolato de Sodio y Trypticosa soya
- Llevar a incubar por 7 días (USP XXIV): Medio Tioglicolato de Sodio a 30 °C - 35°C y Medio Trypticosa Soya a 20 °C - 25°C.
- Aceptar el lote y reportar la prueba como **SATISFACTORIA**, si no hay evidencia de crecimiento microbiano en los medios de cultivo. Al evidenciar crecimiento: Realizar coloración de Gram y Repetir la prueba.
- Reportar la prueba como **NO SATISFACTORIA**, si la segunda prueba evidencia nuevamente crecimiento microbiano en los medios.

##### **Vacunas virales acuosas**

- Hacer control microbiológico del aire de la cabina
- Preparar, limpiar con desinfectante y ubicar los materiales que se van a utilizar en cabina ( Medios de cultivo, Manifold, muestras ).
- Reconstituir los viales con 10 mL de agua destilada y hacer el pool de muestras (1L).
- Agitar por 10 min .

- Alicuotar 300 ml en frascos de 100 ml.
- Contaminar dos de los frascos con una suspensión entre 10-100 UFC.
- Filtrar 100 mL de muestra, con ayuda de una bomba de vacío, en cabina de flujo laminar.
- Lavar tres veces con 100 ml de diluyente "A".
- Tomar la membrana con pinzas estériles.
- Cortar la membrana en partes iguales y adicionar la mitad en cada uno de los medios de recuperación microbiana, Tioglicolato de Sodio y Tripticasa de soya.
- Hacer una filtración utilizando diluyente "A" como control de esterilidad de este.
- Hacer dos filtraciones utilizando una muestra de vacuna contaminada con *S. aureus* y otra con *C. albicans* y sembrar por mitades independientemente en los medios Tioglicolato de Sodio y Tripticasa soya.
- Llevar a incubar por 7 días (USP XXIV): Medio Tioglicolato de Sodio a 30 °C - 35°C y Medio Tripticasa Soya a 20 °C - 25°C.
- Aceptar el lote y reportar La prueba como **SATISFACTORIA**, si no hay aparición de crecimiento microbiano en los medios de cultivo. Al evidenciar crecimiento: Realizar coloración de Gram y repetir la prueba.
- Reportar la prueba como **NO SATISFACTORIA**, si la segunda prueba evidencia nuevamente crecimiento microbiano en los medios.

**RESULTADOS**

**PRUEBA DE ESTERILIDAD**

- M :Mañana
- T :Tarde
- P : Patógenos
- C.P :Control proceso
- SAT :Satisfactorio

**RESULTADOS DE LOS CONTROLES**

**INOCULACIÓN DIRECTA VACUNA VIRAL OLEOSA**

FECHA	HORA	ANALISTA	CABINA	RESULTADO
2002-01-25	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-25	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-01-28	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-28	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-01-30	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-30	T	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-01	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-01	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-04	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-04	T	A. CORTÉS	C.P	SAT

**INOCULACIÓN DIRECTA VACUNA VIRAL ACUOSA**

FECHA	HORA	ANALISTA	CABINA	RESULTADO
2002-02-11	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-11	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-13	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-13	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-14	M	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-14	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-02-18	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-02-18	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-02-20	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-02-20	T	R. CALEÑO	P	SAT

**FILTRACIÓN POR MEMBRANA VACUNA VIRAL OLEOSA**

FECHA	HORA	ANALISTA	CABINA	RESULTADO
2002-01-25	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-25	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-01-28	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-28	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-01-30	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-01-30	T	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-01	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-01	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-04	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-04	T	A. CORTÉS	C.P	SAT

**FILTRACIÓN POR MEMBRANA VACUNA VIRAL ACUOSA**

FECHA	HORA	ANALISTA	CABINA	RESULTADO
2002-02-11	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-11	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-13	M	R. CALEÑO	C.P	SAT
2002-02-13	T	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-14	M	A. CORTÉS	C.P	SAT
2002-02-14	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-02-18	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-02-18	T	R. CALEÑO	P	SAT
2002-02-20	M	A. CORTÉS	P	SAT
2002-02-20	T	R. CALEÑO	P	SAT

**Vacuna oleosa**

Los resultados se determinaron por el tiempo en que cual se presentó la contaminación (Vacuna inoculada con microorganismos)

FM : Filtración por membrana

ID : Inoculación directa

**Vacuna viral acuosa**

2002-01-25	MUESTRA	FM	FM
MAÑANA	vacuna con <i>S. aureus</i>	70 Horas	70 Horas
	vacuna con <i>C. albicans</i>	70 Horas	10 días
TARDE	vacuna con <i>S. aureus</i>	70 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>S. aureus</i>	70 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>S. aureus</i>	64 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	64 Horas	Ausencia

2002-01-28	MUESTRA	FM	FM
MAÑANA	vacuna con <i>S. aureus</i>	22 Horas	7 días
	vacuna con <i>C. albicans</i>	46 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	46 Horas	Ausencia
TARDE	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	7 días
	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	7 días
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia

2002-01-30	MUESTRA	FM	FM
MAÑANA	vacuna con <i>S. aureus</i>	22 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>S. aureus</i>	22 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	46 Horas	Ausencia
TARDE	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia

2002-02-01	MUESTRA	FM	FM
MAÑANA	vacuna con <i>S. aureus</i>	70 Horas	70 Horas
	vacuna con <i>S. aureus</i>	70 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	70 Horas	Ausencia
TARDE	vacuna con <i>S. aureus</i>	64 Horas	64 Horas
	vacuna con <i>S. aureus</i>	64 Horas	5 días
	vacuna con <i>C. albicans</i>	64 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	64 Horas	Ausencia

2002-02-04	MUESTRA	FM	FM
MAÑANA	vacuna con <i>S. aureus</i>	22 Horas	46 Horas
	vacuna con <i>S. aureus</i>	22 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	46 Horas	Ausencia
TARDE	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	40 Horas
	vacuna con <i>S. aureus</i>	16 Horas	40 Horas
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia
	vacuna con <i>C. albicans</i>	40 Horas	Ausencia

Los resultados de los controles de la vacuna viral acuosa se obtuvieron a las 24 horas de incubación.

**Nota:** En todas las pruebas se hicieron lecturas diarias durante el tiempo de incubación y a cada cultivo se le hizo análisis morfológico para verificar la pureza del microorganismo.

## DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se demuestra que la prueba de esterilidad, es una prueba robusta, sólida, repetible y reproducible, pues teniendo en cuenta las diferencias horarias, el cambio de analista y la diferencia de laboratorios, los parámetros a evaluar no tuvieron ninguna alteración o modificación de los resultados esperados.

Es necesario contar con personal capacitado y calificado. La capacitación preliminar de los analistas, donde se adquirieron las destrezas necesarias para el manejo de materiales y equipos permitió la realización de las pruebas evitando los riesgos de contaminación

que se tienen al no seguir las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Lo anterior contribuyó a obtener resultados confiables y además permitió, que al utilizar simultáneamente los dos microorganismos de control en la prueba no se presentara contaminación cruzada.

En la preparación de Tioglicolato de sodio, en la preparación de éste, es necesario utilizar recipientes apropiados que permitan la formación del anillo de resazurina en la parte superior (medio bien elaborado), es decir, recipientes angostos, que tengan una buena cámara de aire y que permitan visualizar bien el crecimiento de algún contaminante.

Los medios cumplieron con las especificaciones establecidas por las casas comerciales y las entidades regulatorias, razón por la cual se indica su buena calidad y además que las pruebas se hicieron dentro de los parámetros establecidos por las BPL.

Se demostró mediante la prueba de promoción de crecimiento que los medios contenían los nutrientes necesarios para que indujeran el crecimiento de algún contaminante en un corto periodo de incubación, de 18 - 24 horas.

Aunque la filtración por membrana es una técnica más dispendiosa y riesgosa por la manipulación en cuanto a tratamiento preliminar de la vacuna, montaje de la unidad de filtración y la transferencia de la membrana a los medios de cultivo, es una técnica más estricta que garantiza seguridad en la esterilidad del producto.

Utilizando ésta técnica se puede procesar mayor cantidad de muestra, 200 ml en filtración Vs 20 ml por inoculación directa, sembrando las muestras por duplicado; esto representa una ventaja, ya que en la empresa se producen lotes de vacuna en grandes volúmenes y estos podrán ser analizados con más seguridad y con una cantidad de muestra más representativa. Por investigación interna en la empresa se ha llegado a pasar hasta 1 litro de vacuna por la membrana.

La filtración por membrana es una técnica más sensible en cuanto a la recuperación de microorganismos:

- La contaminación se puede detectar en pocas horas (16 – 24 h), mientras que por inoculación directa es posible no detectar la presencia del contaminante, al cumplirse el término para la lectura de la prueba.
- Se pueden detectar concentraciones muy pequeñas de contaminante, desde 100 UFC/ml ya que el contaminante se concentra en la membrana, y por inoculación directa si la cantidad de contaminante es muy pequeña cabe la posibilidad de no tomarlo al momento de sembrar o inocular la muestra y por lo tanto no recuperarlo.

En la filtración por membrana, al utilizar diluyente existen dos beneficios:

- Se eliminan todos los restos de vacuna que puedan quedar en la membrana y que inhiben el crecimiento de los contaminantes presentes en el producto.
- No existen problemas de falsos positivos, ya que se eliminan restos de vacuna que interfieren con la lectura de la prueba causando turbidez en el medio.

El timerosal es un compuesto orgánico del mercurio de alta actividad, que en concentraciones pequeñas (0,001 % a 0,002%) reduce notablemente la actividad microbiana en un periodo de 3 – 24 horas, este compuesto es usado como preservativo en diferentes productos, como cosméticos, medicamentos oftálmicos y vacunas. En el caso de las vacunas que contienen como agente preservante el timerosal (Vacunas virales oleosas) se evidenció en la inoculación directa, que al haber restos de la vacuna se inhibió totalmente el crecimiento del control de vacuna inoculado con *C. albicans* y en algunas oportunidades el crecimiento en el control inoculado con *S. aureus*, mientras en la filtración por membrana al retirar por medio de los lavados con diluyente éste agente, se pudieron recuperar los contaminantes en el medio.

Por investigación interna de la empresa se ha demostrado que en un término de 10 horas el timerosal elimina los contaminantes presentes en la vacuna, lo cual indica que para evaluar la esterilidad del producto es necesario retirar el timerosal para obtener resultados confiables y evitar que el preservativo encubra la contaminación. Aunque con estos ensayos también se puede deducir que la vacuna está bien preservada.

Por otro lado se conoce que el medio tioglicolato es un neutralizante de desinfectantes mercuriales, por tal razón, en la técnica de inoculación directa se manifestó más rápido el crecimiento de la contaminación en este medio y no en Medio Trypticasa Soya en las pruebas hechas para vacunas virales oleosas.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo evidencia documentada, de que la prueba de esterilidad realizada por las técnicas de inoculación directa y filtración por membrana, es una prueba reproducible, confiable y sólida, lo cual se reporta bajo el concepto de técnica validada.

La técnica de filtración por membrana para vacunas virales oleosas y acuosas, se reporta como estandarizada e institucionalizada, soportando lo anterior con el procedimiento operativo estándar (PRO)

para la ejecución de la prueba de esterilidad.

Una capacitación oportuna del personal tanto en la realización de la prueba como en las buenas prácticas de laboratorio, minimiza los riesgos de contaminación y garantiza la obtención de resultados confiables.

Un mantenimiento preventivo oportuno de los equipos garantiza seguridad en el procedimiento de la prueba.

La utilización de recipientes adecuados para alcuotar los medios de cultivo en las cantidades apropiadas para la realización de la prueba, es de suma importancia para la interpretación de los resultados obtenidos, ya que permitirán una visualización real de los resultados y evitarán problemas de interpretación (Falsos positivos).

Para que los resultados de la prueba de esterilidad tengan validez es necesario de mostrar que los medios de cultivo empleados contienen los nutrientes necesarios para inducir el crecimiento de contaminantes presentes en las vacunas

Es necesario en la validación conocer si los efectos bacteriostáticos y/o fungistáticos de la vacuna afectan adversamente la veracidad de la prueba de esterilidad, y así tener seguridad y confiabilidad en los resultados obtenidos, ya que sustancias bacteriostáticas y/o fungistáticas pueden dar como resultado falsos positivos y enmascarar la contaminación presente en la vacuna.

Es preciso controlar todos los factores extrínsecos que puedan afectar la veracidad de la prueba, especialmente, la temperatura (Para el control de los equipos), la aireación y la asepsia operacional, ya que estos influyen de manera determinante en la manifestación de contaminantes en los resultados de las pruebas.

El empleo de controles microbiológicos positivos dentro de la prueba de esterilidad, corrobora la efectividad y sensibilidad de las técnicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allende, R. 2001. **Normas internacionales recomendadas para control de vacuna antiaftosa**. 6p. En: VII Seminario internacional de control de vacuna antiaftosa. Río de Janeiro. Brasil.

Bobnschein, M & Voigt, H .1982. **Tratado de tecnología farmacéutica**. Primera edición. Acribia. Zaragoza. España. Págs. 384–385

Centro Panamericano de fiebre aftosa. 1997. **Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa**. Río de Janeiro. Brasil. 259 p.

Davis, B. Dulbecco, R. Eisen, H. Ginsberg, H. 1996. **Tratado de Microbiología**. 4ª. edición. Ed. Masson, S.A. Barcelona. España. Págs. 520-521, 726.

Hunt, R. **Virology-lecture eight.** [en línea]. <[www.vaccinelecturesnotes.htm](http://www.vaccinelecturesnotes.htm)>. [Consulta: 26 Febrero 2002]

Merck. 2000. **Manual de medios de cultivo.** Darmstadt. Alemania. págs 71, 139, 32, 249.

Office International des Epizooties. (OIE). 2000. **Manual of standars for diagnostic tests and vaccines.** 4ª. Edición. Paris. Francia. págs.4-23, 42-52, 145-154.

Organización Mundial de la Salud. 1999. **Reglamentación de vacunas: desarrollo en los organismos actuales de reglamentación farmacéutica.** Ginebra. 56 p.

Organización Mundial de la Salud. OMS, 1983. **Serie de informes técnicos,** No. 530. Ginebra. 67 p.

Organización Mundial de la Salud. OMS, 1995. **Serie de informes técnicos,** No. 858. Informe 45. Ginebra. 43 p.

Organización Mundial de la Salud. OMS, 1992. **Serie de informes técnicos,** No. 322. Informe 42. Ginebra. págs 20-79.

Organización Mundial de la Salud. OMS, 1996. **Serie de informes técnicos,** No. 823. Buenas prácticas de manufactura vigentes. Informe 32. Ginebra. 127 p.

\_\_\_\_\_ **Purificación y análisis de fluidos.** 1997. Memorias: "Validación de técnicas analíticas". Bogotá. Colombia. 22 p.

Pall Gelman Laboratory. 2001. **El libro de filtración.** Dreieich. Alemania. pág.132-151.

Pall Gelman Laboratory. 2001. **Membrana filter technique.** Dreieich. Alemania. 22 p

Panaftosa. 2001. **Bases para establecer los requisitos mínimos de acreditación de sistemas nacionales oficiales para el control de calidad de vacuna antiaftosa.** Río de Janeiro. Brasil. 5p.

The office of the federal register nacional archives and records administration. CFR, 1996. Code of federal regulations. Animal and Animal products. No. 9 Parts 1 to 199. Washington D.C. USA. Págs

U.S. Pharmacopeia National Formulary. 1995. USP. 23. NF. 18 Washington. D.C. USA. Págs.

U.S. Pharmacopeia. 2000. **The standard of quality.** USP XXIV. NF 19. Washington, D.C.USA. Cap.7: Págs.1818-1823.

VICH International Cooperation on Harmonisation of Technical requirements for registration of veterinary medicinal products. 1998. Validation of analytical procedures: Methodology. Bélgica. 10 p.

Dewhurst, S. [en línea]. University of Rochester Medical Center USA. <[www.gencat.es/sanitat/es/entrada.htm](http://www.gencat.es/sanitat/es/entrada.htm)> [Consulta: 25 noviembre 2001].