



Control de Esterilidad para medicamentos de terapias avanzadas

Susana López Hernández
División de Productos Biológicos y Biotecnología
AEMPS



Control de la Esterilidad para medicamentos de terapias avanzadas

Farmacopea Europea Edición 6.6

- **Esterilidad: 2.6.1**
- **Guía para el uso del test de esterilidad: 5.1.9**



- **2.6.1 Ensayo de esterilidad**

- **Consideraciones generales:**

- Se aplica a los medicamentos considerados estériles
- Se debe realizar en condiciones asépticas

- **5.1.9 Guía para el uso del test de esterilidad**

- **Generalidades:**

- El objetivo del ensayo de esterilidad (2.6.1) es proporcionar un control independiente para comprobar que un producto cumple con las exigencias de la Farmacopea Europea



Esterilidad Farmacopea Europea

apartado 2.6.1

- **Métodos**

- 1. Filtración por membrana**

- 2. Inoculación directa**

1 Filtración por membrana



2 Inoculación directa



14 días

Medios de cultivo, temperatura y tiempo de incubación idénticos
Fluido tioglicolato (FTG): bacterias anaerobias y aerobias
14 días a $32 \pm 2^\circ\text{C}$
Fluido tripticasa soja (TSB): hongos y bacterias aerobias
14 días a $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Controles negativos
Condiciones asépticas
Controles ambientales



1 Filtración por membrana

- **Medicamentos filtrables**
Preparaciones acuosas filtrables, productos sólidos solubles, preparaciones alcohólicas, grasas, miscibles o solubles en solventes acuosos o grasos

- **Método cerrado:** ej: “Steritest”
 - Condiciones asépticas, mínima manipulación
 - Filtro poro: no+de 0,45 μm , diámetro: 50mm
 - Filtros especiales para ciertos medicamentos (ej: antibiótico)

- Diluyente estéril

- Agua de peptona (solución neutra de peptona caseína pH:7,1 \pm 0,2)
- Agua de peptona con sustancias neutralizantes y/o inactivantes (ej: P-80)

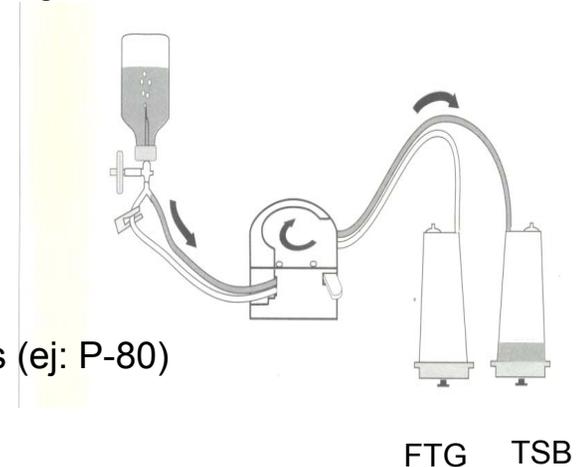
⇒ Humedecer los filtros

⇒ Lavados con 100 ml a cada filtro, máximo 3 veces

- **Si tiene propiedades antimicrobianas:**
lavar la membrana más de 3 veces, máximo 5 lavados de 100 ml por cada filtro

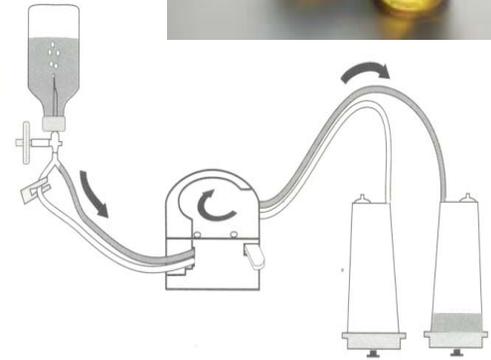
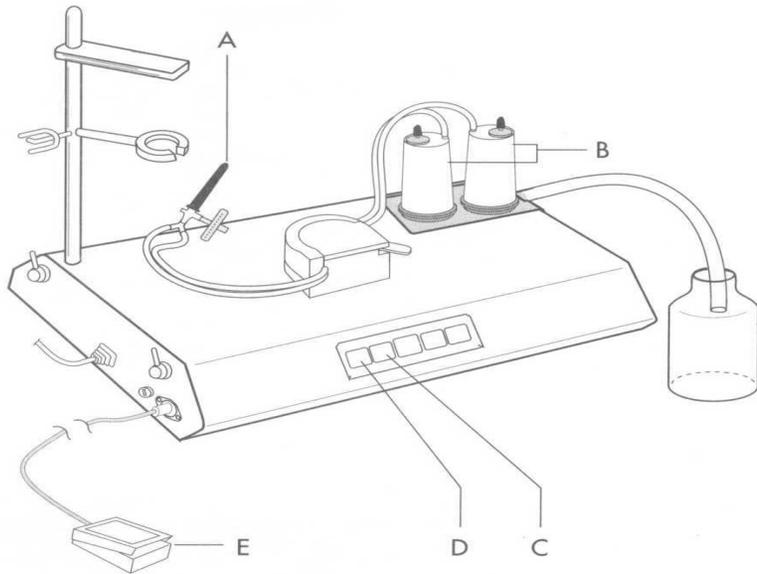
- **Volumen requerido:** no límite en cuanto al máximo volumen
sí mínima cantidad para cada medio de cultivo:
ej: 1-40 ml: usar la mitad del contenido del vial pero no menos de 1ml

número de viales a ensayar depende del tamaño del lote



Control negativo: Filtrar 100 ml diluyente estéril en nuevo dispositivo

STERITEST



- **A:** Aguja del dispositivo del Steritest
- **B:** Canister o contenedores del Steritest
- **C:** Botón de marcha/paro (start/stop)
- **D:** Botón de encendido del aparato (power)
- **E:** Pedal de marcha/paro
- **F:** Entrada de aire a los contenedores o canister
- **G:** Bomba peristáltica
- **H:** Contenedor para desecho producto

2 Método de inoculación directa



- **Método abierto para medicamentos no filtrables**
(líquidos oleosos, aceites y cremas, suturas de catgut y otros materiales de uso veterinario)
- **Volumen requerido:**
 - . mínima cantidad establecida para cada medio de cultivo (FTG/TSB), salvo excepción justificada y autorizada
ej: 1-40 ml: usar la mitad del contenido del vial pero no menos de 1ml
 - . límite en cuanto al máximo volumen:
nunca superar el 10% del medio de cultivo
- **Si tiene propiedades antimicrobianas:**
neutralizar previamente con sustancia neutralizante (ej: penicilinas) o dilución previa en suficiente medio de cultivo

Control negativo: incubar cada medio de cultivo sin muestra



Requisitos previos a la realización del ensayo (2.6.1)

- Material estéril (diluyentes, dispositivos,...)

- Medios de cultivo

1. Esterilidad

- Cada lote
- Incubar 14 días
- Antes o en paralelo al ensayo

2. Propiedades nutritivas (promoción de crecimiento)

- Cada lote
- No+ de 100 ufc (Verificar en paralelo en placas de TSA/SDA la cantidad inoculada)

- Incubar 3 días:

Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium sporogenes, Bacillus subtilis

- Incubar 5 días:

Candida albicans, Aspergillus niger

- Antes o en paralelo al ensayo

- Test de idoneidad del ensayo para el producto



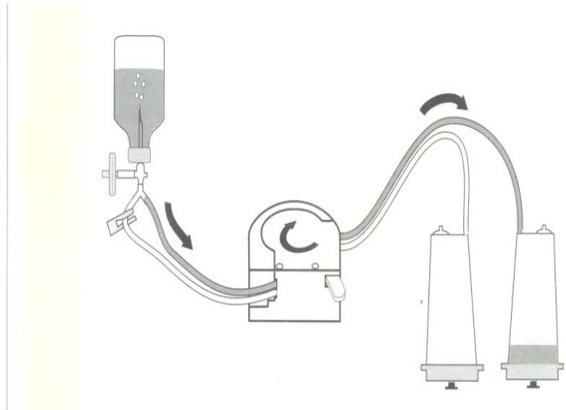
Test de Idoneidad del ensayo para el producto

Objetivo: comprobar que el método es adecuado para controlar la esterilidad del producto (que éste no inhibe el crecimiento de microorganismos)

- Realizar por cada nuevo producto, y si hay algún cambio en las condiciones experimentales del ensayo
- Se realiza en los dos métodos:
Inocular previamente con cada cepa control (por separado) no+ de 100 ufc de:
Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium sporogenes - (FTG)
Candida albicans, Bacillus subtilis, Aspergillus niger- (TSB)
(Mantenimiento cepas: no más de 5 pases)
- Incubación de los medios de cultivo inoculados con cada cepa control:
3 días: bacterias
5 días: hongos
- Comparar visualmente con un blanco (sin producto)
- Se puede hacer en paralelo al propio ensayo de esterilidad

Test de Idoneidad del ensayo para el producto

- 1.- Filtrar medicamento
- 2.- Inocular previamente cada cepa control (por separado) en diluyente a filtrar en el último lavado del ensayo



FILTRACIÓN POR MEMBRANA

- 3.- Añadir cada medio cultivo
- 4.- Incubación

- 1.- Inocular medicamento
- 2.- Inocular cada cepa control (por separado) en cada medio de cultivo (FTG/TSB)



INOCULACIÓN DIRECTA

- 3.- Incubación

3. Test de Idoneidad del ensayo para el producto

Interpretación de resultados

Si se observa crecimiento visible:
ensayo idóneo para el producto probado

Si no se observa crecimiento:
el producto posee actividad antimicrobiana



Modificar condiciones para eliminar propiedades antimicrobianas y repetir test de idoneidad

⇒ El ensayo de esterilidad deberá realizarse en las mismas condiciones que el test de idoneidad

****Aconsejamos neutralizar previamente propiedades antimicrobianas si lleva antibiótico para realizar test idoneidad:***

- **FM:**
 - filtros y canister especiales para antibióticos
 - Incrementar 3-5 lavados máximo para cada filtro
 - diluyente con sustancia neutralizante
- **Inoculación directa:**
 - neutralizar previamente con sustancia neutralizante o dilución previa en suficiente medio de cultivo



Interpretación de los resultados del ensayo de esterilidad 2.6.1 (FM ó Inoculación directa)

- Después de 14 días:
 - No turbidez en los medios de cultivo:
Cumple con ensayo de esterilidad
 - Si turbidez:
No cumple con ensayo de esterilidad

- Si el medicamento probado enturbia el medio de cultivo nada más realizado el ensayo
 - A los 14 días: subcultivo (mínimo 1ml del medio) 4 días más:
 - .- No turbidez: **Cumple** con ensayo de esterilidad
 - .- Si turbidez: **No cumple** con ensayo de esterilidad

Interpretación resultados ensayo de esterilidad (2.6.1)

Ensayo invalidado

- Contaminación en el control negativo
- Fallos demostrables en la realización del ensayo
- Datos control microbiológico ambiental zona del ensayo de esterilidad reflejan fallos
- Caracterización microorganismo aislado en control esterilidad demuestra se debe a fallos en el ensayo (material o técnica utilizada)



repetir en igual condiciones



Si no crecimiento: cumple

Si crecimiento: no cumple

Ensayo de esterilidad 2.6.1

- “- Las condiciones de trabajo en las que el test se realiza se deben controlar periódicamente tomando muestras ambientales del área de trabajo (aire y superficies)
-Durante el ensayo también se controlan las condiciones ambientales”
- Placas control abiertas en la cabina flujo laminar
 - Control-Impronta de dedos

Precauciones frente a la contaminación microbiana (5.1.9)

- **“El ensayo se hará en condiciones asépticas, p.ej. : cabina de flujo laminar clase A en un entorno de clase B o en un aislador”**

1. Inoculación Directa

2. Filtración por membrana

• Zona de trabajo:

- “Zona limpia”

- Presión positiva
- Cabina de flujo laminar de clase A
- Entorno Sala clase B
- Equipo especial
(mascarilla, gorro, guantes, calzas, bata estériles)

- Aisladores

- Clase A en habitación clase C o sin clasificar

⇒ La inoculación de cepas control se hace fuera de la zona limpia o aislador



2.6.27 Control Microbiológico de productos celulares

- Ensayo más adecuado que el 2.6.1 para determinados productos celulares
- Se utiliza en lugar del test 2.6.1 cuando la monografía correspondiente lo indique
- Se puede realizar por métodos manuales o automáticos.

Monografía 2323 células hematopoyéticas humanas

Especificaciones de calidad:

-Calidad microbiológica (recuento de aerobios totales, ensayos para microorganismos específicos)

-Esterilidad 2.6.1 (donde sea aplicable)

TESTS

-Control microbiológico

Realizar según método general 2.6.27

Guideline on human cell-based medicinal products

EMA/CHMP/410869/2006

- Alusión al 2.6.27 y 5.1.6

5.1.6 Métodos alternativos para el control de la calidad microbiológica



2.6.27 Control Microbiológico de productos celulares

- Al menos 2 medios de cultivo adecuados (ej. Medio de cultivo para sangre) para hongos y bacterias aerobias y anaerobias
- Incubar a 35-37°C durante 7 o 14 días según el sistema de detección utilizado
- Se añadirá una proporción adecuada de volumen muestra a cada medio
 - productos hematopoyéticos: $V \geq 10$ ml: 1% total
 $1 \leq V < 10$ ml: 100 μ l
- Comprobar la esterilidad y propiedades nutritivas de cada lote de medio de cultivo
- Listado de microorganismos recomendados para la VALIDACIÓN DEL MÉTODO
- “Dependiendo del tipo de producto, de su método de preparación, del volumen de inóculo usado y del tipo de ensayo, se debe considerar la necesidad de validación del método en presencia del tipo de producto que se vaya a examinar.”



2.6.27 Control Microbiológico de productos celulares

PRECAUCIONES GENERALES

- .- Se debe realizar en **condiciones asépticas** de acuerdo con la regulación existente sobre material potencialmente infeccioso
- .- Las medidas tomadas para evitar la contaminación deben procurar que no afecten a cualquier posible microorganismo presente en el producto
- El ensayo se hará en condiciones de trabajo controladas regularmente, mediante muestreo de la zona de trabajo



MÉTODOS ALTERNATIVOS ENSAYO DE ESTERILIDAD

métodos rápidos

Basados en crecimiento

- Electroquímicos
- Consumo/producción de gas
- Bioluminiscencia (ATP)
- Microcalorimetría
- Turbidimetría
- Basado en fagos

Medida directa

- Citometría fase sólida
- Citometría flujo
- DEFT

Análisis componente celular

- Fenotípicos
 - Inmunológicos
 - Perfil ac. grasos
 - Espectroscopía FTIR
 - Espectrometría masas
- Genotípicos
 - NAAT: PCR tiempo real
 - Genetic fingerprinting



VALIDACIÓN MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL ENSAYO DE ESTERILIDAD EN MEDICAMENTOS TERAPIA CELULAR

- **Farmacopea Europea apartado 5.1.9:** “se puede usar el método oficial modificado u otro alternativo, siempre que se demuestre que los resultados obtenidos en la validación son equivalentes al método oficial sin modificar”

- **Farmacopea Europea apartado 5.1.6:** posibilidad de utilizar métodos rápidos alternativos para el control microbiológico
Se detallan requerimientos generales para su validación



VALIDACIÓN MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL ENSAYO DE ESTERILIDAD

-Verificar que el método analítico es adecuado para el fin previsto:
ensayo de esterilidad

- **Tipos de validaciones (5.1.6)**

- Validación primaria: por el suministrador del método
- Validación para un uso específico: por el laboratorio en los productos que van a ensayar (medicamentos de terapias avanzadas)

Idoneidad del ensayo: por el laboratorio en los productos a ensayar cuando tiene que probar un producto nuevo o hay modificaciones en el método de ensayo



Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHMP/410869/2006

- “Se debe realizar un ensayo exhaustivo para determinar la ausencia de bacterias, hongos a nivel de producto terminado”
- En los casos de productos de terapia celular en los que por su período de validez se impide realizar test de ausencia de bacterias según requerimientos de F.E. se podrán aceptar métodos alternativos validados, si se justifica”



ENSAYO DE ESTERILIDAD EN MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS

Fase final

.- **Esterilidad 2.6.1- Liberación del producto antes de obtener resultados esterilidad**

● Según volumen (haya suficiente), complejidad del producto (filtrable o no), si antibiótico:

.- **Filtración por membrana:** + fácil eliminar actividad antimicrobiana (más lavados, utilizar filtros especiales)

¡Muy importante: idoneidad del ensayo!

● En otros casos:

.- **Inoculación directa** (la actividad antimicrobiana se neutraliza peor)

¡Muy importante: idoneidad del ensayo!

(si se usa menor volumen: justificarlo)

.- **Técnicas rápidas** (bact Alert, PCR, citometría flujo, etc...):

Validación completa con el método de referencia

Fases intermedias

Esterilidad (2.6.1),

Técnicas rápidas, Gram,...



iMuchas gracias!

Susana López Hernández
División de Productos Biológicos y Biotecnología
Correo electrónico: slopez@aemps.es