

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS.

Olvera Ángeles, Jara Héctor*, Gómez Patricia*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad 3000 Colonia Copilco Universidad CP 04510 México DF

Teléfono 5556223759 ext 108, correo electrónico: maot@servidor.unam.mx, *Lambda Científica.

Resumen: La norma NMX-EC-17025-2006 para acreditación de laboratorios solicita una serie de requisitos para mostrar la exactitud y la confiabilidad de las mediciones, en algunos métodos de análisis que usa la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, como son los de tipo microbiológico no se obtiene estrictamente un resultado cuantitativo y se tiene dificultad para cumplir con dichos requisitos, entre ellos se encuentran los relacionados con el aseguramiento de la calidad de las mediciones. El trabajo propone un proceso para cumplir con un programa de aseguramiento de la calidad y hace recomendaciones en 7 puntos críticos en el proceso de medición que permita demostrar la confiabilidad. Como ejemplo de esta propuesta se usa el método: determinación de la actividad antimicrobiana de un germicida de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

1. INTRODUCCIÓN

Los germicidas son productos químicos que destruyen una amplia gama de microorganismos sobre superficies o tejidos. Cuando se adicionan a los preparados farmacéuticos para protegerlos de la contaminación de microorganismos se denominan preservativos. Para determinar la efectividad del sistema preservativo o la actividad germicida se verifica la actividad antimicrobiana del producto usando la NMX-BB-040-SFI-1999, norma que se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específica. Un producto etiquetado como germicida, debe tener un porcentaje de reducción de la cuenta viable de 99,999% en 30 segundos de contacto. La cuenta viable inicial se debe encontrar entre $75 \cdot 10^8$ UFC/mL y $125 \cdot 10^8$ UFC/mL. Los resultados de esta prueba tienen un gran impacto en la salud y en la producción. Los productos críticos en una toma de decisión errónea es en inyectables, oftálmicos, productos dérmicos y preparados orales. Para alcanzar los objetivos de la calidad y poder acreditar la prueba ante la NMX-EC-17025-2006 y gestionar el riesgo de obtener resultados de medición incorrectos es importante tener un sistema eficaz de gestión de las mediciones que asegure que el equipo y los procesos de medición sean adecuados para el uso previsto. La obtención de resultados seguros en métodos microbiológicos depende principalmente de la correcta aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, sin embargo es necesario encontrar una forma para poder cumplir con los requisitos que la

17025 exige. Este trabajo es una propuesta de un sistema de gestión de las mediciones que cumpla con los requisitos que solicita la norma de acreditación NMX-EC-17025-2006 para la prueba específica: Medición de la actividad microbiana en productos germicidas usada para determinar la efectividad de un sistema preservativo.

2.-METODOLOGÍA

Una vez que se ha definido el mensurando que la prueba exige, el método de medición y las tolerancias se discute la forma de controlar 7 factores que este trabajo considera son necesarios para asegurar exactitud y confiabilidad. En el diagrama 1 se presentan los 7 factores y su relación con la incertidumbre de medición.

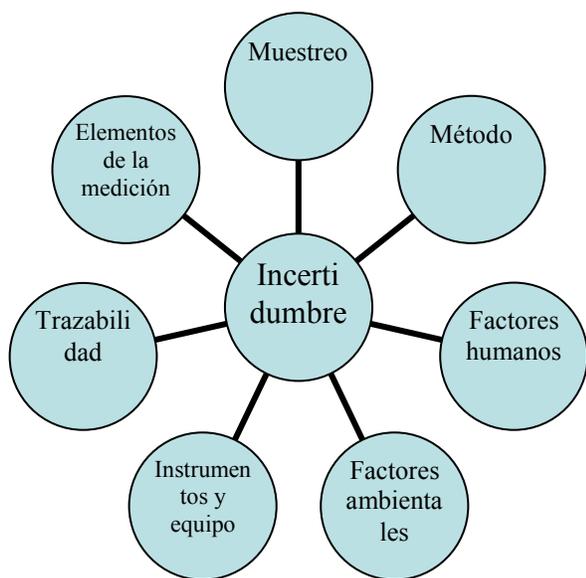


Diagrama 1. Relación de factores con la incertidumbre de medición.

2.1. Identificación del mensurando.

El mensurando corresponde al % de reducción de una cuenta de microorganismos viable inicial entre $75 \cdot 10^8$ UFC/mL y $125 \cdot 10^8$ UFC/mL en un producto que estuvo en contacto con el germicida por 30 segundos.

Interpretación: Un producto etiquetado como germicida debe tener un por ciento de reducción del 99,999%.

2.2. Principio de medición:

La acción germicida se mide por medio del porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos inicial con el siguiente modelo matemático:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{(S)(100)}{CV} \quad (1)$$

Donde:

S = Células sobrevivientes (UFC/mL)

CV = cuenta viable inicial

2.3 Método de medición:

Se cuantifica la cuenta viable inicial y las células sobrevivientes.

2.3.1. Cuenta viable inicial:

En un medio de cultivo líquido se inoculan dos tipos de microorganismos diferentes, la norma recomienda *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11 229 y se hacen las diluciones adecuadas para obtener placas que contengan entre 25 colonias y 250 colonias. Inocular en cajas petri, incubar por 48 horas de 35°C a 37°C y contar el número de colonias en cada caja.

2.3.1. Células sobrevivientes:

La prueba se efectúa sobre suspensiones de microorganismos de los microorganismos mencionados en el punto 2.3.1, agregando el producto antigermicida y dejándolo actuar por 30 segundos y se hacen las diluciones adecuadas para obtener placas que contengan entre 25 colonias y 250 colonias. Se inoculan en cajas petri, se incuban por 48 horas de 35°C a 37°C y se cuenta el número de colonias en cada caja.

Se promedian los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y se calcula el porcentaje de reducción.

3. RESULTADOS

En esta sección se discuten cada uno de los factores a controlar y se muestran en la tabla 1

Tabla 1 Factores que afectan la calidad de los resultados

Factor	Control	herramientas
Humanos	Precisión intermedia	Desviaciones estándar
Método	validación	Pruebas de hipótesis
ambientales	Validación	Pruebas de hipótesis, error
equipo	Calificación, confirmación metrológica, verificación	Pruebas de hipótesis, error, desviaciones estándar
instrumentos	Calificación, verificación,	Incertidumbre

	confirmación metroológica	
trazabilidad	Validación	Stahypolococos aureus ATCC 6538 Escherichia coli ATCC 11229
Manejo de los elementos	Verificación, vigilancia,	Pruebas de hipótesis

3.1 Los factores humanos.

Son controlados a través de estimar la desviación estándar entre analistas y de cada analista. Cinco analistas hacen 10 lecturas. Debido a que no se tienen diferentes niveles para poder hacer un estudio de precisión intermedia se usan las desviaciones estándar entre analistas y de cada analista para dar seguimiento al trabajo de los analistas, a medida que la desviación estándar sea más pequeña indica una menor dispersión lo que significa una mayor confiabilidad en el trabajo experimental.

3.2 Controles ambientales.

La incubación debe llevarse a cabo a 37 °C con una variación permitida de ±1°C. Esta condición única ambiental debe ser monitoreada en cada incubación y la evidencia se recomienda cubrirla con cartas de control donde se grafique los valores de la temperatura de incubación a lo largo del período de incubación. Incluir en la gráfica las incertidumbres y los valores límites permitidos, en este trabajo esos valores permitidos son los que la norma indica, no debe variar en ±1 °C

3.3 I método de medición.

El método de medición en conjunto es validado a través de analizar un germicida previamente probado por otro laboratorio experto que haya obtenido previamente el % de reducción y su incertidumbre, y mostrando la evidencia objetiva mediante una prueba de hipótesis de medias y otra prueba de hipótesis de desviaciones estándar. La prueba de medias lo que indica es si hay diferencia significativa entre los valores obtenidos por el laboratorio experto y el laboratorio que hace la prueba. La prueba de hipótesis de desviaciones estándar lo que indica es si hay diferencia significativa entre las incertidumbres reportadas por el laboratorio experto y el laboratorio que hace la

prueba. Si no existe diferencia significativa es la evidencia objetiva de que se verificó que los requisitos especificados son para el uso previsto. Es decir que el método es adecuado para poder evaluar su acción germicida.

3.4 Equipos e instrumentos

El equipo es calificado y los instrumentos calibrados y verificados periódicamente.

Los instrumentos que requieren verificación y calibración: termómetro para incubadora que evite variaciones mayores de ± 1,0°C, verificación del cronómetro. La forma que se propone verificar es a través de hacer una confirmación metroológica en el momento que llega al laboratorio después de ser calibrado. La confirmación metroológica debe hacerse en el punto de hielo *frappe* colocado en un Dewar, a 37°C y en el punto de ebullición del agua. Posteriormente se hace esta prueba en dos fechas intermedias al periodo de calibración. Y la evidencia objetiva que se está cumpliendo y manteniendo el termómetro a las mismas condiciones que se recibió es haciendo una prueba de hipótesis si hay diferencia significativa entre los valores obtenidos en el momento que se recibió el termómetro al laboratorio después de ser calibrado y en el momento en que fue verificado.

Es muy importante que la acción del germicida sea por 30 segundos, por lo que es necesario contar con un cronómetro calibrado. El equipo que requiere ser calificado: incubadora, contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, lente amplificador y el registrador mecánico, microscopio óptico. Los puntos críticos de calificación de equipo son presentados en la tabla 2.

Tabla 2 Calificación en puntos críticos

Especificación	Equipo	CD	CO	CI	CF
Uniformidad de temperatura	Incubadora	x	x	x	x
Uniformidad en el conteo por golpe	Contador mecánico	x	x		x
Amplificación	Microscopio óptico	x	x		x
Uniformidad de campo visual	Microscopio óptico	x	x		x
Amplificación	Lente amplificador	x	x		x
Estabilidad de	Contador	x	x		x

luz	de colonias				
Cuadrícula	Contador de colonias	x	x		x
Uniformidad de campo visual	Contador de colonias	x	x	x	x

3.5 Elementos del método de medida.

Los elementos críticos para la prueba son los relacionados con la conservación de la cepa y los medios de cultivo.

Pero antes de hacer la validación es necesario tener la seguridad de que los medios de cultivo que se usan tienen una calidad adecuada. Para ello se debe controlar: 1.- Preparación del medio de cultivo 2. Comprobación de las propiedades nutritivas

3.5.1 Para la preparación de los medios de cultivo con medios deshidratados es necesario exigir el certificado analítico de cada medio y usar agua de la calidad Farmacopea.

3.5.2 Para comprobar las propiedades nutritivas se preparan suspensiones de microorganismos que contengan aproximadamente 10^2 UFC/mL se inocula con 1 mL de suspensión (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) se incuba a $(32,2 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ por tres días y se comprueba posteriormente el crecimiento con pruebas bioquímicas.

3.6 Muestreo

Para considerar el tamaño de la muestra n puede usarse la relación:

$$n = (z_\alpha + z_\beta)^2 \frac{\sigma^2}{d}$$

z_α = valor de z correspondiente al riesgo α fijado

z_β = valor de z correspondiente al riesgo β fijado

σ^2 = corresponde a la varianza de la prueba

d = valor mínimo de la diferencia o efecto que se requiere detectar

3.7 Trazabilidad e incertidumbre.

3.7.1. Trazabilidad.

Lograr la comparación a patrones de reconocimiento internacional es decir la trazabilidad en esta prueba es sumamente difícil porque debe lograrse tanto con los instrumentos como con los materiales de referencia. El caso de los instrumentos se logra mediante la calibración a patrones primarios nacionales pero los materiales de referencia en esta prueba son cepas de microorganismos las que pueden contaminarse en el transcurso de la prueba y perder la trazabilidad, por lo que este trabajo recomienda que la trazabilidad sea cumplida a través de la calibración de cada instrumento y con una cepa control, la norma indica usar *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 11229. La trazabilidad se logra a través de la conservación de la cepa a partir de cultivos de trabajos y resiembras congeladas. La cepa de referencia debe ser confirmada a través de pruebas bioquímicas. Se debe asegurar un sistema para obtener el número de microorganismos inicial para poder evaluar la efectividad de la acción germicida. La norma indica que la cuenta inicial debe ser de $75 \cdot 10^8$ UFC/mL a $125 \cdot 10^8$ UFC/mL. La propuesta del sistema es la siguiente: Preparar 10 suspensiones del microorganismo, en esta prueba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en agua peptonada 0,1% y diluir hasta obtener una suspensión que leía a una longitud de onda de 580 nm, dé una lectura entre 3% y 5% de transmitancia. Sembrar estas diluciones y hacer una cuenta de las células viables presentes. El número de cuenta corresponderá al promedio y la incertidumbre (u_{ATC}) a la desviación estándar de la media.

3.7.2. Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro cuantitativo de la calidad que cualquier proceso de medición debe de ir acompañado, en este proceso en el que se mide pero no bajo las unidades del Sistema Internacional, se cuantifican unidades formadoras de colonias, pero debido a la naturaleza de la forma como se contabilizan este conteo no es un número exacto como se podría esperar, se observan inconsistencias en las repeticiones del conteo por lo que este número lleva una incertidumbre que este trabajo considera que se encuentra propagada de la siguiente forma:

$$u_{\%} = \sqrt{\left(\frac{\partial\%}{\partial S}\right)^2 u_s^2 + \left(\frac{\partial\%}{\partial CV}\right)^2 u_{CV}^2}$$

$$\frac{\partial\%}{\partial S} = \frac{100}{CV}$$

$$\frac{\partial\%}{\partial CV} = -\frac{(S)(100)}{CV^2}$$

u_s = incertidumbre de las células sobrevivientes

u_{CV} = incertidumbre de cuenta viable inicial

La incertidumbre del conteo de las células sobrevivientes y de la cuenta viable inicial es estimada a través de dos componentes: los estudios de repetibilidad y reproducibilidad hechos previamente para controlar los factores humanos y la incertidumbre de tipo A.

$$u_s = \sqrt{u_{Ryr}^2 + u_{tipoA}^2}$$

$$u_{CV} = \sqrt{u_{Ryr}^2 + u_{tipoA}^2 + u_{ATC}^2}$$

5. CONCLUSIONES

La obtención de resultados seguros en métodos microbiológicos depende principalmente de la

correcta aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, sin embargo es posible encontrar una forma para poder cumplir con los requisitos que la 17025 exige y debido a que el mensurado corresponde a un valor numérico es posible estimar una incertidumbre que se interpreta como una forma cuantitativa de expresar la calidad de la medición de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.

REFERENCIAS

- [1] NMX-CC-10012-IMNC-2004. Sistemas de gestión de las mediciones – Requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición.
- [2] NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos Generales de Análisis- Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.
- [3] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Vol. 1 2004
- [4] Asociación Española de Farmacéuticos de la industria. Validación de Métodos Analíticos. 2001. España

ESPECIFICACIÓN	EQUIPO	CD	CO	CI	CF
Uniformidad de temperatura	Incubadora	x	x	x	x
Uniformidad en el conteo por golpe	Contador mecánico	x	x		x
Amplificación	Microscopio óptico	x	x		x
Uniformidad del campo visual					
Amplificación	Lente amplificador	x	x		x
Estabilidad de luz	Contador de colonias	x	x	x	x
Cuadrícula					
Uniformidad campo visual					