



AGUA PARA INYECCIÓN - BIOFILM, ENDOTOXINAS Y LA RELACIÓN ENTRE ELLAS

A menudo, se malinterpreta el mecanismo de higienización y el desarrollo de cargas biológicas en los sistemas de aguas farmacéuticas. Los microorganismos, especialmente en el agua y en los lazos de agua, están siempre presentes y tienen la capacidad de adaptarse a su entorno. Aunque la industria hace todo lo posible por controlar y eliminar las cargas biológicas, los métodos de higienización tradicionales no son eficaces al cien por cien. En este artículo técnico se analiza la eficacia de los sistemas de agua caliente para inyección (WFI) y la relación entre una existencia continua de carga biológica y la detección de endotoxinas, incluso sin crecimiento de colonias microbianas.

Joan Pagès, Business Area Manager Process Analytics, METTLER TOLEDO

MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIANOS

Durante décadas, la industria farmacéutica ha estado buscando métodos rápidos para la detección de la carga microbiana y, en los últimos años, se han introducido varios análisis rápidos para comprobar la esterilidad, el aire y el agua farmacéutica. La adopción de nuevos métodos rápidos para la detección de la carga microbiana en la industria farmacéutica no solo requiere la aceptación de los nuevos análisis, sino también entender que estos proporcionan datos en tiempo real para mejorar el control del proceso.

El método de análisis actual para determinar la presencia de microorganismos en el agua requiere la incubación de una muestra durante al menos 5 días. Esta prueba no revela la presencia de organismos viables y,

como se indica en la USP, solo puede recuperar entre el 0,1 % y el 1,0 % de las células microbianas viables presentes realmente en una muestra. Otro reto de los análisis tradicionales es el mito o la creencia de que un sistema de agua caliente para inyección no contiene ningún biofilm.

Se le atribuye a Benjamin Franklin, uno de los padres fundadores de los Estados Unidos, una frase que bien podría ser la mejor respuesta en cuanto a la presencia de bacterias y que describe la realidad de los sistemas de agua: «En el vino hay sabiduría, en la cerveza hay libertad y en el agua hay bacterias».

Los análisis del sector farmacéutico para la WFI consisten en test para conductividad, TOC y detección de microbios y *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (para endotoxinas). Este artículo técnico se centra en la relación entre el método tradicional de recuento en placas de los análisis microbianos y el ensayo LAL.

LIMITACIONES DEL MÉTODO TRADICIONAL DE RECUENTO EN PLACAS Y DE LAS UFC

El análisis microbiano actual requiere el cultivo de muestras de sistemas de aguas farmacéuticas. Este método solo proporciona instantáneas de un volumen limitado y no permite el control en tiempo real de un sistema de agua ni proporciona una imagen real de la carga biológica del sistema. El método de ensayo, desarrollado por el Dr. Koch y el Dr. Petri en 1887, se basa en el aspecto visual de una colonia de células y no se



Figura 1.

puede utilizar para determinar si una colonia surgió de una célula, cien células o mil.

Una unidad formadora de colonias (UFC) es la medición utilizada para estimar el número de bacterias o células fúngicas viables en una muestra. El recuento de UFC requiere el cultivo de los microbios y, a continuación, el recuento solo de las células viables, es decir, células sanas y capaces de experimentar una división celular. El desarrollo de las UFC requiere el cultivo de una masa, una cadena o un conjunto de células, y solo crecerán las células viables. Además, la formación de colonias depende de muchas variables como el tipo de organismo, la fase del organismo, los factores de estrés, la temperatura de incubación, la humedad, el tipo de medio y la duración de la incubación.

La mayoría de los recuentos en placas se realiza con un medio estándar (R2A o TSA) de 30 a 35°C durante 5 a 7 días, pero los organismos con un crecimiento más lento o dañados por la higienización pueden necesitar un medio diferente y una incubación a una temperatura inferior durante 14 o incluso 21 días. Debido a las limitaciones y las deficiencias del método tradicional de recuento en placas, la industria farmacéutica está buscando activamente tecnologías de detección de cargas biológicas en tiempo real para aguas farmacéuticas.

SISTEMAS DE AGUA Y BIOFILM

La adhesión microbiana y el crecimiento de biofilm se producen en todos los sistemas de agua, independientemente del caudal, el material de construcción, el flujo turbulento y las fuerzas de cizallamiento. Las bacterias son ubicuas y están por todas partes: en superficies, en sistemas de agua, en el aire, en la piel o en la ropa. La contaminación por carga biológica no se puede evitar, sino que solo se puede supervisar y controlar. En teoría, la mayoría de los organismos en suspensión acuosa debería morir en los sistemas de agua caliente para inyección, pero en función del diseño de ingeniería, la antigüedad del sistema, los materiales de construcción, la rugosidad de las superficies, los tramos muertos, los puntos de muestreo, los codos, las juntas y otros factores, los organismos sobrevivirán y se desarrollará un biofilm.

La biofilm madura en comunidades o estructuras tridimensionales complejas. En aguas de cizallamiento bajo, de flujo bajo o estancadas, el crecimiento de la biofilm es más «esponjoso» y susceptible a la fuerza de cizalla, mientras que, en sistemas de agua con un flujo alto y fuerzas de cizallamiento altas, se desarrolla como

una biofilm tenaz y resistente en la superficie. Se cizallan más flóculos a partir de biofilms «esponjosos» que a partir de biofilms tenaces. Esto se traduce en recuentos mayores en aguas estancadas y, por lo tanto, en un aumento de las bacterias planctónicas. Estos flóculos se liberan durante los ciclos de higienización, enjuague del circuito de agua y durante la alta demanda de producción. Independientemente de las características de un sistema de agua, si el biofilm se desarrolla y se consolida en un sistema de agua, rara vez se logrará matar o eliminar por completo con agua caliente, productos químicos o limpieza mecánica. Un hecho muy importante sobre el biofilm es que es hidrofóbico y repele el agua a una velocidad superior a la del PTFE. Esta capacidad para repeler el agua significa que el agua caliente no penetra en las capas base del biofilm, sino que solo interacciona con la capa superior. Si se utiliza un circuito de agua con un caudal elevado, se reducirá el desprendimiento de los flóculos o bacterias planctónicas. Sin embargo, aunque un caudal elevado puede reducir el desprendimiento, también expone el biofilm a más nutrientes y podría aumentar la velocidad de crecimiento de la biofilm en la superficie. Una capa de biofilm es una agregación compleja de microorganismos marcada por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que actúan como anclaje a la superficie.

Las comunidades de biofilms se comunican, mediante un proceso denominado «detección de cuórum», y en presencia de peligro o muerte («reacción de lucha o huida») segregan metabolitos protectores dentro de la estructura tridimensional de la comunidad para crear una especie de protección de las capas dentro de la biofilm. Por lo tanto, si la capa superior de una comunidad de biofilms está expuesta al agua caliente para inyección, las capas inferiores pueden protegerse con la capa de metabolitos y continuarán multiplicándose.

Los organismos de un sistema de agua caliente para inyección pueden encontrarse en un estado estresado, ser formadores de esporas o viables, pero no cultivables (VBNC) con métodos estándar, y puede resultar muy difícil capturar suficientes organismos viables para su cultivo con métodos de recuento en placas estándar. Sin embargo, un analizador de detección de carga biológica en línea detectará organismos viables, VBNC y esporas.

En la *figura 2* se muestra un sensor de presión que se retiró del sistema de agua caliente para inyección de una empresa farmacéutica. El examen de la pieza reveló claramente que estaba cubierta por una biofilm vivo y en crecimiento. Sin embargo, el método de muestreo

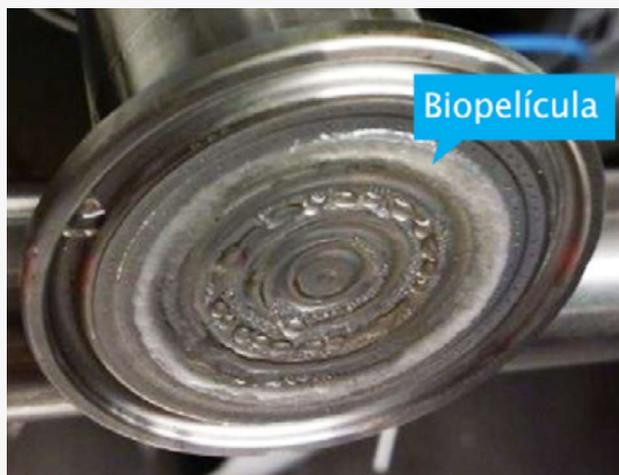


Figura 2.

simple estándar que usaba la empresa midió 0 o 1 UFC con la mayoría de las placas incubadas. En esta situación, un analizador de detección de carga biológica en línea habría detectado la carga biológica del sensor, ya que el biofilm se desprendía y se volvía planctónica en el sistema de agua. Este ejemplo de un sistema de agua caliente para inyección que no mostraba unidades formadoras de colonias cuando se comprobó con el método tradicional, muestra la conexión de la relación del recuento en placas estándar con los ensayos LAL.

ENDOTOXINAS Y BIOFILMS

Las endotoxinas son un tipo de pirógeno o agente causante de fiebre y son un componente lipopolisacárido (LPS) de la pared celular exterior de las bacterias gramnegativas, como la *E. coli*. Las endotoxinas forman parte de la membrana exterior de dichas bacterias, independientemente de que los organismos sean patógenos o no. Aunque el término «endotoxina» se utiliza ocasionalmente para referirse a cualquier toxina bacteriana asociada a las células, en bacteriología se reserva específicamente para referirse al complejo LPS asociado a la membrana externa de patógenos gramnegativos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholerae*. El análisis farmacéutico actual para endotoxinas es el ensayo LAL y es necesario para WFI y vapor puro. El ensayo LAL reacciona con el lipopolisacárido de endotoxinas bacterianas (LPS), que es un componente de la membrana de las bacterias gramnegativas, como se ha comentado anteriormente.

Teóricamente, si el método de recuento en placas ofreciera una imagen real de la carga biológica del agua,

el resultado de un análisis de 0 UFC sería la prueba de que no hay microorganismos en el sistema. Sin embargo, tal y como se ha comentado y mostrado anteriormente en la imagen del sensor de presión, el biofilm no solo se adaptará, sino que podrá sobrevivir en agua caliente para inyección. En varias instalaciones farmacéuticas, se ha observado que los resultados del recuento en placas son normalmente de 0 UFC y a veces de 1 UFC y, sin embargo, no superan con frecuencia el ensayo LAL. Este resultado del ensayo LAL demuestra aún más las limitaciones del método de análisis tradicional, la capacidad del biofilm para adaptarse y sobrevivir en ciclos de agua caliente para inyección y la necesidad de detectar la carga biológica en tiempo real.



Figura 3.

Es por todo lo expuesto anteriormente que METTLER TOLEDO apuesta por la innovación y decide desarrollar un analizador de detección de carga biológica en línea llamado 700ORMS. Dicho analizador proporciona los datos y la información en tiempo real que se necesitan para supervisar un sistema de agua y determinar si está bajo control. Además, su tecnología de medición identifica la presencia de carga biológica en situaciones en las que los métodos de recuento en placas no son fiables.

También, el 700ORMS se puede usar para determinar si los procedimientos de higienización del sistema de agua son suficientes y eficaces, y si el ciclo de mantenimiento es lo suficientemente frecuente como para mantener la calidad del agua requerida y, por lo tanto, reducir el riesgo para el producto.

En tanto los organismos reguladores fomentan el uso de métodos microbiológicos rápidos y alternativos, el 700ORMS es una opción a tener en cuenta ☺