



VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

**Referencia USP 29,
Farmacopea Mexicana
Validación de métodos analíticos AEFI**



Ensayos biológicos

Los métodos biológicos se emplean para determinar la potencia o el contenido de ciertos elementos que no pueden ser ensayados por otros métodos químicos o físicos





El principio de un ensayo biológico

Es la comparación de la respuesta de la sustancia patrón (o de referencia) de concentración conocida con la del producto a ensayar, con una probabilidad determinada

Los ensayos biológicos como su nombre lo indica, utilizan materia viva (animales, células, microorganismos entre otros)

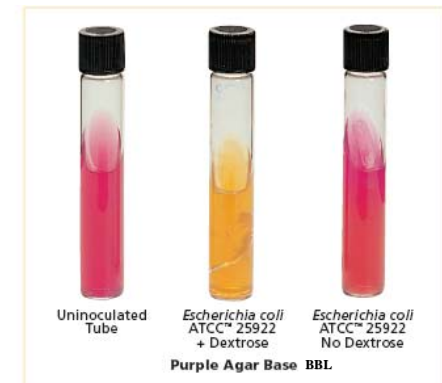


Ensayos biológicos

Se dividen en ensayos cualitativos y cuantitativos

Ensayos cualitativos

En los cualitativos se identifica una sustancia por alguna reacción característica producida en una especie particular de entidad biológica





Ensayos biológicos

Ensayos cuantitativos

Los ensayos cuantitativos, permiten determinar la potencia o concentración de un activo en la muestra



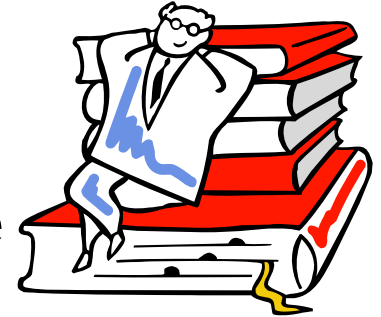
Valoración por cilindro- placa o en placa : Difusión

Valoración turbidimétrica



Ensayos biológicos

- Pueden ser difíciles de "validar"
- "Validez" se hace prácticamente **caso por caso**



■ *Lo recomendable es: Cumplir estrictamente las monografías de los Ensayos biológicos en las farmacopeas*



- **Validamos todos los métodos microbiológicos?**



Requieren validación

- **Ensayos de límites microbianos**
- **Recuento microbiano**
- **Ensayo de esterilidad**
- **Ensayo de eficacia de preservativo**
- **Programa de control de ambiente**
- **Ensayos biológicos**



Validación de ensayos microbiológicos



Es virtualmente imposible validar completamente los procedimientos de ensayo **para cada microorganismo**



LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DEBE DEMOSTRAR:

- **Que cualquier sustancia inhibitoria presente en la muestra ha sido neutralizada/inactivada o diluida a niveles por debajo del nivel inhibitor.**
- **La capacidad de los medios para promover el crecimiento de los microorganismos que puede afectarse por el proceso de preparación del medio, por los procesos de esterilización y de almacenamiento, entre otros.**



Actividades preliminares:

- Neutralizar/inactivar o diluir las sustancias inhibitoras.
- Enfrentamiento periódico de los medios.
- Tener los métodos normalizados
- Tener los Equipos de medición calibrados.

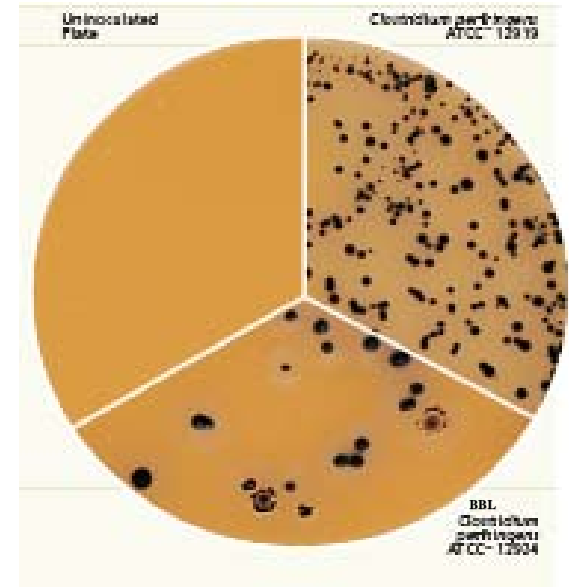


Parámetros que deben incluirse

- **Temperatura y tiempo de incubación**
- **Todos los microorganismos no pueden crecer en los medios**
- **Variaciones en los medios puede afectar la recuperación**
- **Desinfectantes o preservativos inhibidores**
- **Muestra**
 - **procedimientos**
 - **manejo, almacenamiento, transporte**

Parámetros que deben incluirse

- **Métodos**
 - incorporación en placa / diseminación en placa
 - filtración por membrana
 - Número más probable
- **Tamaño de la muestra**
- **Dilución de ensayo**



Parámetros que deben incluirse

- **Condiciones de la filtración por membrana**
- **Condiciones de incubación**
- **Criterios de aceptación**





Parámetros que deben incluirse

- **Microorganismos de enfrentamiento para la validación**

Los recomendados por las farmacopeas.

Staphylococcus aureus

Bacillus subtilis

Escherichia coli

Candida albicans

Aspergillus niger

- **Tamaño del inóculo**

- 10 -100 ufc totales inoculadas en de 0.1ml a 100mL de la solución de ensayo.

Los microorganismos deben ser enfrentados por separado y no mezclados en un ensayo



Requerimientos de la validación de ensayos de esterilidad

- pH, promoción del crecimiento y esterilidad de los medios
- Ensayo de la **ESTÁSIS (comprobación del medio)**
- Control ambiental
- Controles negativos
- Microorganismos de enfrentamiento según USP



Unidades y estándares de referencia

- La potencia de los antibióticos está especificada en Unidades o μg de actividad.
- La preparación de los estándares se puede en algunos casos con anticipación como una solución madre y las diluciones el día de la ejecución del ensayo.



Pruebas de aptitud de los medios **Deben cumplir**

- Prueba de promoción de crecimiento
- Estabilidad de los medios preparados.
 - Para un mes de almacenamiento, en envase cerrado, verificar cada 2 semanas
 - Para un año de almacenamiento, en envase impermeable y bien cerrado, verificada cada 3 meses.



Reporte de Validación

① Objetivo y alcance del método, aplicabilidad

② Tipo de analito y la matriz sobre la que se hizo la validación,

③ Detalles del analito, reactivos, estándares de referencia y control y estabilidad de las muestras preparadas.

④ Procedimiento para la verificación de la calidad de los estándares y reactivos químicos usados

⑤ Condiciones de seguridad



Reporte de Validación

⑥ Parámetros del método

⑦ Parámetros críticos establecidos a través del test de robustez

⑧ Listado de equipos, funcionamiento, condiciones de desempeño. IQ,OQ,PQ

⑨ Detalle de las condiciones y cómo fue realizado el proceso, incluyendo la preparación de la muestra

⑩ Tratamiento estadístico y cálculos realizados

⑪ Procedimientos de control rutinario



Reporte de Validación

- ⑫ **Registros como cromatogramas, espectros y curvas de calibración**
 - ⑬ **test de aceptación de las variables**
- ⑭ **Resultados de la incertidumbre de la medición**
 - ⑮ **Criterios para revalidación**
- ⑯ **Persona que desarrolló y validó el método inicialmente**
- ⑰ **Resumen y conclusiones**