

# Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



77.

Control de esterilidad de los productos  
farmacéuticos y de terapia celular preparados  
en salas de ambiente controlado

## Editores

Emilia Cercenado Mansilla  
Rafael Cantón Moreno

## Coordinadora

María Pía Roiz Mesones

## Autores

Pilar Egea Miranda  
Virginia Rodríguez Garrido  
Patricia Ruiz Garbajosa  
María Pía Roiz Mesones



ISBN: 978-84-09-44228-7

**EDITORES:**

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.  
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

**SUGERENCIA DE CITACIÓN:**

Egea Miranda P, Rodríguez Garrido V, Ruiz Garbajosa P, Roiz Mesones MP. Control de esterilidad de los productos farmacéuticos y de terapia celular preparados en salas de ambiente controlado. 2022. 77. Roiz Mesones MP (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2022.

**AVISO:**

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web [www.seimc.org](http://www.seimc.org)”

# Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de  
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

## 77. Control de esterilidad de los productos farmacéuticos y de terapia celular preparados en salas de ambiente controlado. 2022

Coordinadora:

María Pía Roiz Mesones<sup>1</sup>

Autoras:

Pilar Egea Miranda<sup>2</sup>

Virginia Rodríguez Garrido<sup>3</sup>

Patricia Ruiz Garbajosa<sup>4</sup>

María Pía Roiz Mesones<sup>1</sup>



Servicios de Microbiología. <sup>1</sup>Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander; <sup>2</sup>Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba; <sup>3</sup>Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona; <sup>4</sup>Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

## ÍNDICE

1.	Introducción.....	5
2.	Normativa Vigente.....	6
3.	Gestión del sistema de calidad: requisitos previos a la realización del ensayo.....	7
	3.1 Control de los medios de cultivo.....	8
	3.1.1 Esterilidad.....	8
	3.1.2 Propiedades nutritivas (promoción del crecimiento).....	8
	3.2 Test de idoneidad del ensayo para el producto (ensayo de idoneidad del método).....	9
4.	Control de esterilidad de los preparados farmacéuticos.....	11
	4.1. Tipo de preparados .....	11
	4.2. Recogida de muestras.....	11
	4.3 Frecuencia del muestreo.....	12
	4.4. Transporte y conservación de la muestra.....	12
	4.5. Procesamiento de la muestra.....	12
	4.6. Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	14
	4.7. Criterios de interpretación e información de los resultados.....	14
	4.8. Registros.....	14
5.	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos.....	15
	5.1 Tipos de preparados.....	17
	5.2 Recogida de las muestras.....	17
	5.3 Frecuencia del muestreo.....	18
	5.4 Transporte y conservación de la muestra.....	18
	5.5 Procesamiento de la muestra, medios de cultivo y condiciones de incubación.....	18
	5.6 Criterios de interpretación e información de los resultados.....	18
	5.7 Registros.....	19
	5.8 Ensayo de detección de Micoplasmas.....	19
6.	Métodos de control no basados en la detección de microorganismos mediante cultivo bacteriano y fúngico.....	22
	6.1 Técnicas de ampli icación de ácidos nucleicos (TAAN).....	22
	6.2 Endotoxinas.....	23
	6.3 Seguridad viral.....	23
7.	Bibliografía.....	24
	7.1 Documentos de consulta.....	24
	7.2 Referencias.....	24

## DOCUMENTOS TÉCNICOS

**PNT-CE-01.** Control de esterilidad de productos farmacéuticos.

**PNT-CE-02.** Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos.

**PNT-CE-03.** Control de *Mycoplasma* spp. en los preparados de terapia celular.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el Procedimiento de la SEIMC nº 74, **CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL DE SALAS BLANCAS (CÉLULAS HUMANAS, PRODUCTOS FARMACÉUTICOS, REPRODUCCIÓN ASISTIDA)**, recientemente publicado, se realiza una descripción de las salas blancas, o salas de ambiente controlado, así como de los requisitos que deben reunir para limitar y controlar la concentración de partículas de diferentes tamaños en suspensión en el aire, los niveles de contaminación microbiana y mantener las condiciones ambientales controladas con el propósito de conseguir, en unos casos la protección y seguridad de las personas y en el caso que nos ocupa, para proteger los productos fabricados de una posible contaminación.

La expansión de las salas blancas a los Servicios de Farmacia (preparación de citostáticos, formulaciones parenterales), Unidades de Reproducción Asistida (preparación de embriones), Servicios de Medicina Nuclear (radiofármacos y gammatecas) y Bancos de Sangre y Tejidos (preparados celulares) es hoy una realidad en la rutina asistencial de nuestro Sistema de Salud. Este documento hará referencia al control de esterilidad de todos aquellos medicamentos y productos sanitarios elaborados en estas instalaciones hospitalarias y que están destinados a la terapia de los pacientes. Se aplica a los medicamentos considerados estériles los cuales se deben elaborar en condiciones asépticas. El objetivo del ensayo de esterilidad, es proporcionar un control independiente para comprobar que un producto cumple con las exigencias de la normativa existente (Real Farmacopea Española 5ª edición <https://extranet.boe.es/farmacopea/> y López Hernández, S. <https://docplayer.es/21698102-Control-de-esterilidad-para-medicamentos-de-terapias-avanzadas-susana-lopez-hernandez-division-de-productos-biologicos-y-biotecnologia-aemps.html>). No obstante, hay que tener en cuenta que la esterilidad de un producto se debe asegurar con la aplicación de un proceso de producción adecuadamente validado para no correr el riesgo de obtener un producto no estéril o deteriorado. De ahí la importancia de cumplir los principios de la Guía Europea de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos donde se recalca la importancia de trabajar con personal cualificado, locales y equipos de producción adecuados, trabajar cumpliendo procedimientos validados y realizar controles ambientales y su análisis durante la fabricación (ver procedimiento 74).

Algunos de los preparados que nos ocupan, son los conocidos como medicamentos de terapias avanzadas (MTA) los cuales se han ido desarrollando de una forma exponencial en los últimos años. Los MTA son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular somática) y tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Los MTA fueron regulados en la Unión Europea dentro del ámbito de los medicamentos con la publicación del Reglamento Europeo y del Consejo sobre Medicamentos de Terapia Avanzada. Esta normativa trata a los MTA como al resto de los medicamentos en lo que a autorización previa a la comercialización, necesidad de demostrar calidad, seguridad, eficacia y vigilancia postautorización se refiere<sup>1</sup>. El Real Decreto 477/2014, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial, posibilita la fabricación de los MTA en los hospitales.

Los productos sanitarios más frecuentemente elaborados en los hospitales de nuestro sistema de salud, y que requieren de un control de esterilidad, están descritos en los siguientes apartados de este documento y básicamente se aplica a todos aquellos preparados farmacéuticos considerados estériles y a los hemoderivados y, en relación a los MTA, fundamentalmente aquellos basados en la terapia celular y que se componen de preparados celulares a partir de la médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical. No siempre está claramente diferenciado el límite entre los MTA y otros tipos de tratamientos con células o tejidos. En estos casos, es la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*) quien, a través del Comité de Terapias Avanzadas (CAT), establece que productos se consideran MTA.

Desde que en noviembre de 2018 se hizo la presentación de las Terapias Avanzadas en el Sistema Nacional de Salud, las terapias CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor-T*) ya son una realidad en algunos de nuestros hospitales realizándose en alguno de ellos el proceso de producción de estos linfocitos T.

Aunque este documento hace referencia exclusivamente a aquellos medicamentos o productos considerados como estériles, existen también normas para el control microbiológico de productos no estériles. Están basados en el recuento microbiano de bacterias mesófilas, hongos y levaduras para determinar si una sustancia o preparación satisface una especificación establecida de calidad microbiológica. Todas las especificaciones necesarias para su realización se encuentran disponibles para su consulta en los documentos 2.6.12 (CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: ENSAYOS DE RECuento MICROBIANO) y 2.6.13 (CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: ENSAYO DE MICROORGANISMOS ESPECIFICADOS) de la Real Farmacopea Española.

Como conclusión, podemos resumir que la fabricación de cualquier medicamento tiene que cumplir con las normas de correcta fabricación para asegurar, en el caso que nos ocupa, la obtención de un producto estéril y no deteriorado y que para comprobar que el producto final cumple con las exigencias de la normativa existente, se debe realizar un control de esterilidad.

## 2. NORMATIVA VIGENTE

En el Procedimiento 74, se detallan todas las normativas relacionadas con las salas de ambiente controlado. Sin embargo, el control de esterilidad de todos aquellos medicamentos preparados o fabricados para uso humano y que se consideren estériles, debe complementarse con otro tipo de normativa específica la cual está basada en la Farmacopea Europea. En este apartado, se hace mención a la normativa relacionada con todo el proceso de fabricación y control de esterilidad de los productos sanitarios que se indica a continuación.

- **Real Farmacopea Española 5ª edición.** <https://extranet.boe.es/farmacopea/>
- **Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario.** Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. <https://www.aemps.gob.es/industria-farmacautica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>
- **Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria.** Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. [https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP\\_JUNIO\\_2014\\_VF.pdf](https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)
- **Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products. Part I and Part II.** Pharmaceutical Inspection Convention. Mayo 2021. <https://picscheme.org/docview/4588>
- **Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHNP/410869/2006.** [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf)
- **Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada.** Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/normas-correcta-fabricacion/nueva-guia-NCF-ATMPs.pdf>
- **Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial.** BOE núm. 144 de 14/06/2014.
- **Reglamento (CE) No 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 De Noviembre de 2007 Sobre Medicamentos de Terapia Avanzada y por el que se modifican La Directiva 2001/83/CE y El Reglamento (CE) no 726/2004** <https://www.boe.es/doue/2007/324/L00121-00137.pdf>
- **Directriz Q5A de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH): Evaluación de la Seguridad Viral de los Productos Obtenidos por Biotecnología y Procedentes de Líneas Celulares de Origen Humano o Animal.** [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx\\_6445\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx_6445_es.pdf)

- **Note for Guidance on the Warning on Transmissible Agents in Summary of Product Characteristics (Spcs) and Package Leaflets for Plasma-Derived Medicinal Products (CPMP/BPWG/BWP/561703).** [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03_en.pdf)

### 3. GESTIÓN DEL SISTEMA DE CALIDAD: REQUISITOS PREVIOS A LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO

La calidad farmacoterapéutica incluye diferentes dimensiones, como la efectividad y la seguridad, que hacen difícil alcanzar la calidad total; uno de los mejores sistemas para asegurar la calidad está recogido en la ISO 9001 y que en el caso que nos ocupa se fundamenta en 3 pilares:

1. Documentación escrita de los procedimientos que se realizan que incluye: el manual de la calidad, los procedimientos generales, los procedimientos normalizados de trabajo, las instrucciones de trabajo y los registros.
2. La monitorización. Definimos la esterilidad como la ausencia de microorganismos viables; la estabilidad de un producto no se puede garantizar por la realización de ensayos, sino que se tiene que asegurar por aplicación de un proceso de producción adecuadamente validado y continuado de los procesos, con indicadores objetivos de la calidad, un cuadro de mandos de cada actividad y un sistema continuado de auditorías tanto externas como internas.
3. Análisis y acciones de mejora donde se especificarán a los responsables de cada proceso, las acciones correctivas y preventivas, así como el comité interno de la calidad.

La calidad de la preparación de un producto farmacéutico no se puede asegurar solo mediante el análisis de una muestra al final del proceso, sino que debe construirse desde el principio y durante todo el proceso de preparación. Los servicios de farmacia son los últimos responsables de la calidad de los medicamentos preparados. Todos los procesos deben adecuarse y basarse en los principios de buenas prácticas de fabricación incluyendo en particular el uso de personal cualificado y convenientemente formado, locales adecuados, equipo de producción diseñado para su fácil limpieza y esterilización si fuera necesario y procedimientos validados para todas las etapas críticas de producción. También es fundamental el control ambiental y análisis durante la fabricación.

Es importante la realización de Test de *Media Fill*, única herramienta que permite calificar al personal autorizado para realizar técnicas asépticas para operaciones en área estéril; para demostrar el conocimiento de trabajo mediante técnica aséptica en la elaboración de medicamentos estériles, la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria* recomienda aplicar la validación aséptica con medio de cultivo como se especifica en la sección USP 797 de la Farmacopea Americana (<https://www.sefh.es/fichadjuntos/USP797GC.pdf>) en el apartado *Media Fill test*. Este método consiste en la simulación de todo el proceso de fabricación, pero utilizando un medio de cultivo estéril (caldo o agar triptona soja) en lugar del producto. Los viales obtenidos, serán incubados a una temperatura de 20°-25°C ó 30°-35°C por un mínimo de 14 días. Si las dos temperaturas van a ser utilizadas para la incubación, se mantendrán los viales al menos 7 días para cada temperatura. El test de *Media Fill* se debe realizar al menos 1 vez al año.

En los capítulos de la USP 797 dedicados a la elaboración de preparaciones, tanto estériles como no estériles, en el apartado dedicado a la formación del personal y evaluación, indican que todo el personal implicado en los procesos de elaboración de preparados no estériles y estériles debe estar previamente formado y debe demostrar su competencia y cualificación (estériles), y debe someterse a una actualización y reevaluación cada 12 meses. El entrenamiento y evaluación del personal debe quedar documentado.

Tal y como se detalla en la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria* ([https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP\\_JUNIO\\_2014\\_VF.pdf](https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)), los servicios de farmacia son los encargados de elaborar una matriz de riesgo, la cual es de utilidad en la evaluación de los riesgos de las preparaciones farmacéuticas. Aportar esta información a los laboratorios de microbiología es de utilidad para determinar la importancia y la interpretación de los resultados obtenidos. La determinación del nivel de riesgo se debe llevar a cabo antes de la producción de un medicamento por primera vez.

**El ensayo de esterilidad** se aplicará a aquellas sustancias, preparaciones o artículos que según la farmacopea deben ser estériles. El objetivo del ensayo de esterilidad es proporcionar un control independiente para comprobar que un producto cumple con las exigencias de la Real Farmacopea Española (sección 2.6.1 ESTERILIDAD). Para llevarlo a cabo es necesario realizar un control de los medios de cultivo para comprobar su esterilidad y propiedades nutritivas, además de un ensayo de idoneidad del método, que nos permitirá demostrar que el método microbiológico elegido para cada producto es adecuado, permitiendo el crecimiento de microorganismos patrón en nuestro producto y usando los medios de cultivo indicados.

### 3.1. CONTROL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para llevar a cabo el ensayo de esterilidad se necesitan medios de cultivo adecuados que cumplan las especificaciones de la Farmacopea. Estos medios son:

1. Medio líquido con tioglicolato para cultivo de bacterias anaerobias; aunque también permite detectar bacterias aerobias. El medio líquido con tioglicolato debe incubarse a 30-35°C.
2. Medio con hidrolizado de caseína y soja (TSB), adecuado para el cultivo tanto de hongos como de bacterias aerobias. El medio con hidrolizado de caseína y soja debe incubarse a 20-25°C.

En los medios de cultivo utilizados, debe comprobarse que satisfacen unos requisitos mediante la realización de los siguientes ensayos que pueden aplicarse antes del análisis del producto o bien en paralelo:

#### 3.1.1. Esterilidad

Hay que incubar muestras de los medios de cultivo (comerciales y fabricados "in house"), a las temperaturas indicadas previamente, durante 14 días. Transcurrido este periodo de incubación, los medios satisfacen el ensayo si no se observa proliferación de microorganismos.

#### 3.1.2. Propiedades nutritivas (promoción del crecimiento)

Se debe realizar un ensayo de fertilidad del medio para bacterias aerobias, anaerobias y hongos, y hay que analizar cada lote de medio, ya sea comercial y listo para usar, o bien preparado a partir de un medio deshidratado o de los componentes. Las cepas de microorganismos adecuadas se indican en la tabla 1, tomada de la sección 2.6.1 de la Real Farmacopea Española.



Tabla 1.- Microorganismos patrón para la realización de los ensayos de fertilidad

<b>BACTERIAS AEROBIAS</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
<b>BACTERIA ANAEROBIA</b>
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293
<b>HONGOS</b>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Las muestras de medio líquido se inoculan con un pequeño número (como máximo 100 UFC) de los microorganismos indicados y posteriormente se incuban los medios sembrados con bacterias durante 3 días y los medios sembrados con hongos durante 5 días. Los medios se consideran adecuados si se observa crecimiento de los microorganismos.

Existen comercializadas cepas de referencia calibradas que consisten en bolas hidrosolubles que contienen el número preciso de microorganismos.

a) *Ensayo de promoción del crecimiento de frascos de hemocultivo*

Los frascos de hemocultivo contienen un medio enriquecido adecuado, según la farmacopea, para detectar contaminación bacteriana y fúngica en productos celulares. Al igual que con cualquier otro medio de cultivo utilizado para realizar ensayos de esterilidad, es necesario realizar un ensayo de fertilidad del medio con anterioridad.

La esterilidad de cada lote del medio se lleva a cabo incubando a 35-37°C un frasco aerobio y otro anaerobio durante al menos 7 días en el incubador automatizado.

El ensayo de promoción de crecimiento se realiza sembrando en 2 frascos de cada medio entre 10-100 UFC de cada una de las cepas de referencia (ver tabla 2) e incubando a 35-37°C durante 7 días en incubador automatizado. El ensayo será satisfactorio si se obtiene crecimiento en todos los frascos sembrados. Este ensayo debe realizarse por duplicado.

Tabla 2.- Microorganismos utilizados para el ensayo de promoción del crecimiento

<b>Medio aerobio</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
<b>Medio anaerobio</b>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285, CIP 77.16, NCTC 9343

### 3.2. TEST DE IDONEIDAD DEL ENSAYO PARA EL PRODUCTO (ENSAYO DE IDONEIDAD DEL MÉTODO)

El objetivo es comprobar que el producto es capaz de soportar el crecimiento de las cepas patrón o de referencia. El test de idoneidad, consiste en realizar la misma metodología del ensayo de esterilidad del producto (ver punto 4.5 de este documento) con las siguientes modificaciones según la metodología utilizada:

- a. Filtración a través de una membrana. Transferir el contenido a analizar a una membrana filtrante; después añadir un inóculo que contenga como máximo 100 UFC a la porción final del diluyente estéril utilizado para enjuagar el filtro.
- b. Inoculación directa. Después de transferir el contenido de uno o varios envases del producto a estudiar al medio de cultivo, añadir un inóculo que contenga como máximo 100 UFC.

En ambos métodos, deben utilizarse los microorganismos descritos anteriormente en el ensayo de fertilidad del medio para bacterias aerobias y anaerobias y hongos (ver tabla 1 del punto 3.1.2 de este documento). Se deben incubar los recipientes un máximo de 5 días. De forma paralela se puede realizar el ensayo de fertilidad que serviría como control positivo.

Si en presencia del producto que desea analizarse no se observa crecimiento evidente, se considera que el producto tiene actividad antimicrobiana que no se ha eliminado satisfactoriamente en las condiciones del ensayo y se deberán modificar las condiciones para eliminar la actividad antimicrobiana y repetir el ensayo de idoneidad del método.

Este ensayo de idoneidad del método se efectúa:

- a) cuando el ensayo de esterilidad debe realizarse en un nuevo producto
- b) cada vez que se realiza una modificación de las condiciones experimentales del ensayo. Tal y como se ha comentado anteriormente, el ensayo de idoneidad del método se puede realizar al mismo tiempo que el ensayo de esterilidad del producto a examinar.

### Ensayo de idoneidad del método para frascos de hemocultivo

Este método está indicado para los productos hematopoyéticos y de terapia celular. Consiste en realizar una validación del método en presencia del tipo de preparación a examinar. Se valida la especificidad (ausencia de resultados falsos positivos), sensibilidad (límite de detección) y reproducibilidad. El límite de detección del ensayo se determina utilizando como inóculo el producto contaminado en diferentes grados, con los siguientes microorganismos indicados en la Real Farmacopea Española (sección 2.6.27 Control microbiológico de productos celulares), elegidos por su probabilidad de contaminación y sus requisitos de crecimiento:

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437
<i>Propionibacterium (Cutibacterium) acnes</i>	ATCC 11827
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610, CIP 80.27, NCTC 12982

En función del origen de las células y de otros factores, como los resultados de cultivos anteriores positivos, puede ser necesario modificar el listado de microorganismos patrón a ensayar. Por ejemplo, en la Farmacopea Europea (2.6.27. *Microbiological examination of cell-based preparations*) la cepa control de *Yersinia enterocolitica* es sustituida por una cepa control de *Micrococcus* spp. (ATCC 700405).

De cada uno de estos microorganismos, se deben inocular como máximo 100 UFC en la botella de hemocultivos en presencia del producto a examinar. De forma paralela, se debe realizar un control de inóculo para garantizar un recuento inferior a 100 UFC. El ensayo de idoneidad debe realizarse por triplicado

#### **Observación e interpretación de los resultados.**

Si después de la incubación se observa una proliferación de los microorganismos inoculados (cepas patrón o de referencia) evidente y comparable a la observada en el recipiente de control sin producto, se considera que el producto no tiene actividad antimicrobiana en las condiciones del ensayo o que dicha actividad se ha eliminado satisfactoriamente. El ensayo de esterilidad puede realizarse entonces sin otra modificación.

Por el contrario, si en presencia del producto a examinar no se observa una proliferación evidente y visualmente comparable a la observada en el recipiente de control sin producto, se considera que el producto tiene una actividad antimicrobiana que no se ha eliminado satisfactoriamente en las condiciones del ensayo y se deben modificar las condiciones para eliminar la actividad antimicrobiana y repetir el ensayo de idoneidad del método.

## **4. CONTROL DE ESTERILIDAD DE LOS PREPARADOS FARMACÉUTICOS**

### **4.1. TIPOS DE PREPARADOS**

El ensayo de esterilidad se aplica a todos aquellos preparados farmacéuticos considerados estériles. Concretamente, en los servicios de farmacia hospitalaria, el control de esterilidad se aplicará a los productos estériles preparados en lotes uniformes. El ensayo de esterilidad de estos productos se realizará siguiendo las especificaciones de la sección 2.6.1 ESTERILIDAD de la Real Farmacopea Española descritas en el punto 4.5 de este documento.

Se define como “lote” al conjunto homogéneo de envases sellados preparados de tal manera que el riesgo de contaminación sea el mismo para cada una de las unidades que lo constituyen. La definición de lote aplicada a las preparaciones en los servicios de farmacia hace referencia a un número determinado de preparaciones normalizadas o serie de preparaciones, para responder a las necesidades futuras de los pacientes.

### **4.2. RECOGIDA DE MUESTRAS**

Para realizar el control de esterilidad, el número mínimo de unidades a examinar depende del tamaño del lote. Como es evidente es imposible realizar un análisis de cada uno de los envases que forman parte de un lote, por lo que es necesario diseñar un plan de muestreo apropiado. Por este motivo se seleccionará un número determinado de unidades basándonos en la hipótesis de que en el análisis del contenido de todos los envases del lote se obtendrá el mismo resultado. En el caso de producción en condiciones asépticas, se recomienda examinar muestras introducidas en los envases al principio y al final del lote y después de cualquier intervención significativa.

En la tabla 3 se resume el número mínimo de unidades a examinar atendiendo a las recomendaciones de la Real Farmacopea Española.

Tabla 3.- Número mínimo de unidades a examinar según el tamaño del lote:

Tipo de preparación	Nº de unidades en el lote	Nº mínimo de unidades a examinar para cada medio
<b>Parenteral</b>	≤100 envases	El 10% de los envases, pero como mínimo 4
	100-500 envases	10 envases
	>500 envases	El 2% de los envases, pero como máximo 20 (en el caso de las preparaciones parenterales de gran volumen, como máximo 10 envases)
<b>Oftálmicas y otras preparaciones no inyectables</b>	≤200 envases	El 5% de los envases, pero como mínimo 2
	>200 envases	10 envases
	Si el producto se presenta en envases unidos, aplicar el esquema descrito anteriormente para las preparaciones de administración parenteral	

Por otra parte, según las recomendaciones de la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria* ([https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP\\_JUNIO\\_2014\\_VF.pdf](https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)), se debe realizar un control microbiológico en todas aquellas preparaciones estériles compuestas por más de 25 unidades por lote. Este control se realizará una vez finalizada la preparación, pero antes de la liberación del lote.

#### 4.3 FRECUENCIA DEL MUESTREO

El control microbiológico de esterilidad se realizará siempre tras la producción de un nuevo lote siguiendo las recomendaciones de muestreo recogidas en el punto 4.2.

#### 4.4 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

El transporte de los medios de cultivo ya inoculados se realizará de forma inmediata en contenedores de transporte adecuado y a temperatura ambiente.

En general, las muestras se deben recibir en el laboratorio dentro de las 2 horas siguientes tras su recogida. Si no se pueden lograr estos tiempos para el transporte, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente no más de 24 horas. Es importante enviar las muestras lo antes posible para su inmediata incubación, ya que no pueden conservarse en refrigeración.

Los contenedores con medio líquido se sellarán con film de plástico para evitar contaminaciones durante su traslado. Las muestras se enviarán al laboratorio de Microbiología perfectamente identificadas y se registrarán en el SIL (sistema informático de laboratorio) para garantizar la trazabilidad dentro del laboratorio.

#### 4.5 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Puede utilizarse la técnica de filtración a través de membrana o siembra directa del producto en medio de cultivo. (sección 2.6.1 ESTERILIDAD, de la Real Farmacopea Española) En ambos casos deben incluirse controles negativos apropiados. La técnica de filtración a través de una membrana se utiliza siempre que la naturaleza del producto lo permita, es decir, para preparaciones acuosas filtrables, preparaciones alcohólicas u oleosas y preparaciones miscibles o solubles en disolventes acuosos u oleosos, siempre que estos disolventes no tengan un efecto antimicrobiano en las condiciones del ensayo. En este apartado, realizaremos un resumen de los métodos a realizar pudiendo consultar la documentación especificada para detalles más concretos.

**a.Filtración a través de una membrana.** Para la filtración por membrana, el producto (ya sea puro o en diluyente, según corresponda) se pasa a través de un filtro con un tamaño nominal de poro de como máximo 0,45 µm y cuya eficacia para retener microorganismos se haya demostrado. Es necesario filtrar inmediatamente. Si el producto tiene propiedades antimicrobianas, el filtro se puede lavar al menos tres veces (pero no más de cinco veces por filtro) con 100 ml de un diluyente estéril seleccionado para ser utilizado en el ensayo de idoneidad del método (por ejemplo, una disolución neutra de 1 g/L de peptona de carne o de caseína).

El contenido a examinar puede ser transferido a una o varias membranas, pero utilizando siempre como mínimo las cantidades de producto a examinar prescritas en la tabla 4.

Tabla 4.- Cantidades de producto a examinar según sus características

Cantidad por envase	Cantidad mínima que se ha de utilizar para cada medio, salvo excepción justificada y autorizada
<b>LÍQUIDOS</b>	
Menos de 1 mL	El contenido total de cada envase
1-40 mL	La mitad del contenido de cada envase, pero como mínimo 1 mL
Más de 40 mL pero no más de 100 mL	20 mL
Más de 100 mL	El 10% del contenido del envase, pero como mínimo 20 mL
Líquidos antibióticos	1 mL
Preparaciones insolubles, cremas y pomadas que deben ponerse en suspensión o emulsionarse	Utilizar el contenido de cada envase de modo que se obtengan como mínimo 200 mg
<b>SÓLIDOS</b>	
Menos de 50 mg	El contenido total de cada envase
50 mg o más pero menos de 300 mg	La mitad del contenido de cada envase, pero como mínimo 50 mg
De 300 mg a 5 g	150 mg
Más de 5 g	500 mg
Catgut y otros hilos de sutura para uso veterinario	3 segmentos de hilo (cada uno de 30 cm de largo)

Cuando el contenido de un solo envase no sea suficiente para realizar estos ensayos, se puede utilizar el contenido de  $\geq 2$  envases para sembrar los distintos medios.

El filtro de membrana es entonces transferido a TSB a 20° a 25°C y caldo de tioglicolato a 30° a 35°C durante al menos 14 días. Si se ha utilizado una sola membrana, ésta puede ser cortada asépticamente en dos partes iguales y transferirlos a los medios de cultivo.

Ventajas del uso de este método: posee alta sensibilidad y menor incidencia de falsos negativos, además de permitir evaluar todo el volumen de producto si fuera necesario. Principal desventaja: mayor probabilidad de contaminación.

**b.Siembra directa del medio de cultivo.** En este caso se transfiere la cantidad de la preparación a examinar, indicada en la tabla 4, directamente al medio de cultivo; el volumen del producto utilizado no será superior al 10% del volumen del medio.

Si el producto a examinar tiene actividad antimicrobiana, hay que efectuar el ensayo después de haberla neutralizado con una sustancia neutralizante adecuada o bien por dilución con una cantidad suficiente de medio de cultivo. Cuando sea necesario examinar un volumen importante del producto, es preferible utilizar un medio de cultivo concentrado, preparado teniendo en cuenta la dilución posterior.

Líquidos oleosos: en este caso hay que emplear medios suplementados con un emulsionante apropiado en concentración adecuada, determinada en el ensayo de idoneidad del método (por ejemplo, polisorbato 80).

Pomadas y cremas: preparar una dilución de aproximadamente 1/10 emulsionando con el emulsionante seleccionado en un diluyente estéril adecuado, por ejemplo, una disolución neutra de 1 g/L de peptona de carne o de caseína. Transferir el producto diluido a un medio que no contenga emulsionante.

Los medios sembrados se deben incubar durante como mínimo 14 días y observar los cultivos varias veces durante el periodo de incubación. Cada día hay que agitar suavemente los medios que contengan productos oleosos. No obstante, si se utiliza el medio líquido con tioglicolato para la detección de microorganismos anaerobios, hay que reducir la agitación todo lo posible con el fin de mantener las condiciones anaeróbicas.

#### 4.6 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Los medios de cultivo recomendados por la Farmacopea son el caldo tioglicolato, que permite el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias y el caldo caseína y soja (TSB), que permite la recuperación de bacterias aerobias y hongos.

Las condiciones de incubación recomendadas por la Farmacopea son las siguientes:

- Caldo tioglicolato: 30°-35°C durante 14 días
- Caldo caseína y soja: 20°-25°C durante 14 días

#### 4.7 CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los cultivos se examinarán diariamente hasta completar los 14 días de incubación. Si el producto a examinar enturbia el medio de modo que la presencia o ausencia de proliferación microbiana no puede evaluarse visualmente, 14 días después del comienzo de la incubación, hay que transferir muestras del medio (cada una como mínimo de 1 mL) a otros recipientes que contengan el mismo medio fresco e incubar a continuación los recipientes iniciales y los nuevos durante como mínimo 4 días.

Si a los 14 días no se observa turbidez en el medio, el producto analizado satisface el ensayo de esterilidad. Por el contrario, si en este periodo se detecta turbidez en el medio se realizará un subcultivo en medios sólidos generales (por ejemplo, agar sangre o agar chocolate) y diferenciales que se incubarán durante 48-72 horas. Las colonias de bacterias y/o hongos recuperadas de estos medios se identificarán a nivel de especie mediante las técnicas microbiológicas rutinarias (por ejemplo, MALDI-TOF). En este caso, el producto no satisface el ensayo de esterilidad y el cultivo se debe informar como positivo indicando la especie o especies identificadas. No es necesaria la realización rutinaria de antibiogramas de las especies recuperadas de estos cultivos.

Ante un ensayo de esterilidad en el que se observa proliferación microbiana, habría que considerar revisar los siguientes puntos:

- a) Los resultados del control microbiológico de las instalaciones donde se realizan los ensayos de esterilidad no son satisfactorios
- b) La evaluación del procedimiento experimental utilizado para efectuar el ensayo en cuestión pone de manifiesto algún problema
- c) Se observa proliferación microbiana en los controles negativos
- d) Después de la identificación de los microorganismos aislados en el ensayo, el crecimiento de esta o estas especies puede atribuirse inequívocamente a problemas relacionados con los materiales y/o las técnicas utilizados en el ensayo de esterilidad

Cuando el ensayo se declara inválido, se debe repetir con el mismo número de unidades que se utilizaron en el ensayo inicial. Si en este caso en el ensayo de esterilidad no se detecta crecimiento bacteriano, se considera que el producto satisface el ensayo de esterilidad. Por el contrario, si en la repetición del ensayo se vuelve a detectar crecimiento microbiano, el producto a examinar no satisface el ensayo de esterilidad.

#### 4.8 REGISTROS

Según las recomendaciones de la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria*, en las preparaciones estériles todo crecimiento microbiano debe ser investigado y documentado en un informe de desviaciones por escrito. Los registros de trabajo han de conservarse un periodo de tiempo suficiente que satisfaga los requisitos legales. En cualquier caso, los registros se deben conservar



al menos un año tras la fecha de caducidad del producto terminado. Los procedimientos y las instrucciones de trabajo (incluidas las prescripciones) deben conservarse al menos durante cinco años tras su empleo. Los documentos en que se detalle el trabajo realizado (cuadernos, hojas de cálculo), informes parciales, finales y la información que se genere a partir de los datos brutos, debe quedar igualmente archivada y accesible.

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

## 5. CONTROL DE ESTERILIDAD DE LOS PREPARADOS DE TERAPIA CELULAR Y DERIVADOS HEMATOPOYÉTICOS

### A) Introducción

En este apartado se hará referencia al control microbiológico de los productos celulares los cuales engloban en líneas generales, a los derivados hematopoyéticos y los preparados de terapia celular.

La terapia celular, junto a la terapia génica y la ingeniería de tejidos, constituyen los 3 grandes grupos de tratamientos incluidos en lo que se denomina medicamentos de terapia avanzada (MTA) que, tal y como se ha comentado anteriormente, incluyen productos de origen autólogo (del mismo paciente), alogénico (de un donante) o xenogénico (de un animal). Los medicamentos de terapia celular somática se utilizan principalmente para el tratamiento de enfermedades que carecían, hasta ahora, de un tratamiento eficaz como el cáncer, diabetes, infarto de miocardio, Parkinson, etc., y que se benefician de la capacidad regenerativa, inmunomoduladora y de cicatrización, que presentan las células madre.

Las células madre son células no especializadas que tienen la capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse a varios linajes celulares con funciones específicas. Según su capacidad de diferenciación, se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las más utilizadas son 1) las células madre pluripotentes, embrionarias o inducidas (pueden diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo) y 2) multipotentes, adultas, somáticas o específicas de tejido (su potencial de especialización se limita a uno o varios linajes celulares). Las células madre adultas y, dentro de este grupo, las células madre mesenquimales (CMM), son las más utilizadas y las que más aplicaciones tienen en terapia celular, por su mayor facilidad de obtención, alta capacidad de expansión y diferenciación *in vitro* y menor riesgo de formación de teratomas. Además, son células con una alta capacidad para producir factores de crecimiento, migrar a otras regiones del cuerpo y ejercer funciones regenerativas e inmunomoduladoras.

La *International Society of Cellular Therapy* (ISCT, «Sociedad Internacional de Terapia Celular») estableció en 2006 las características mínimas que deben cumplir las CMM:

- 1) Capacidad de adherencia al plástico en cultivo.
- 2) Expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos del tipo CD34, CD45 y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos.
- 3) Ser multipotentes y presentar una alta plasticidad para diferenciarse *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.

Según la normativa vigente, un medicamento de terapia celular somática es un medicamento biológico con las características siguientes:

- 1.- Contiene células o tejidos, o está constituido por ellos, que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante.
- 2.- Presenta propiedades para ser usado por seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabó-

lica de sus células o tejidos.

No siempre está claramente diferenciado el límite entre los MTA y otros tipos de tratamientos con células o tejidos. En estos casos, es la EMA quien, a través del Comité de Terapias Avanzadas (CAT), establece que productos se consideran MTA.

En cuanto a su origen, las CMM se obtienen principalmente de médula ósea, tejido adiposo y sangre del cordón umbilical. Es imprescindible el cultivo *in vitro* de las células madre para lograr 3 propósitos: i) expansión clonal, ii) modificación genética con ADN recombinante y iii) aislamiento, identificación y diferenciación *in vitro*. Este procedimiento debe llevarse a cabo en condiciones estrictas de esterilidad para evitar la contaminación de los preparados celulares. El Reglamento (EC) N.º 1394/2007 (<https://www.boe.es/doue/2007/324/L00121-00137.pdf>) regula la producción a nivel industrial de los MTA que se distribuyen en Europa. Se especifica en esta norma que aquellos medicamentos que se producen a nivel local en un Estado miembro, con estándares de calidad específicos para ser utilizados para una prescripción médica individual y bajo la responsabilidad de un facultativo, quedan fuera de esta normativa. Es lo que se conoce como cláusula de exención o exclusión hospitalaria. Sin embargo, y según este mismo reglamento, no están exentos de cumplir con las normas de calidad, ya que deben someterse a los procedimientos de autorización propios de cada estado, asegurar la trazabilidad nacional y los requerimientos de farmacovigilancia y cumplir con estándares similares a los que se exigen para los MTA industriales.

De entre los múltiples procedimientos de control llevados a cabo sobre los MTA, nos centraremos en este documento en el control de bacterias, hongos y micoplasmas. Otros ensayos se llevan a cabo generalmente fuera del ámbito del laboratorio de microbiología: análisis de endotoxinas, análisis de fenotipo mediante citometría de flujo, de viabilidad, citogenético, entre otros.

## **B) Control microbiológico de productos celulares / Test de esterilidad**

### **Control bacteriano y fúngico**

El control de la esterilidad de los productos de terapia celular y derivados hematopoyéticos no se lleva a cabo habitualmente mediante el “test de esterilidad” (Real Farmacopea Española, capítulo 2.6.1) utilizado para otros productos preparados en salas blancas, puesto que existe un método más sensible y rápido aprobado por la Farmacopea Europea. Está descrito en el capítulo 2.6.27 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS CELULARES de la Real Farmacopea Española. Este procedimiento puede realizarse por métodos manuales o automatizados y se utiliza en lugar del test de esterilidad cuando la monografía correspondiente lo indique. Como se ha comentado anteriormente, es imprescindible llevar a cabo la validación previa del sistema de detección de microorganismos en el producto a ensayar (test de idoneidad), así como disponer de medios de cultivo validados mediante test de esterilidad y promoción del crecimiento por cada lote (Ver punto 3.1 y 3.2 de este documento).

El uso de los sistemas automatizados de hemocultivo, como un método alternativo para la prueba de esterilidad del producto, ha sido abrumadoramente favorable en los últimos 20 años, con la mayoría de los estudios centrados en el rendimiento de los sistemas Bactec (Becton Dickinson) y BacT/Alert (bioMérieux)<sup>2</sup>. Estas plataformas son ventajosas en comparación con el método manual descrito en USP 71, ya que proporcionan un monitoreo continuo automatizado y detección objetiva del crecimiento microbiano, que a menudo puede confundirse con la naturaleza turbia de los productos de terapia celular, lo que genera dificultades en la interpretación del cultivo a través del método USP 71.

Actualmente, la Farmacopea Europea (sección 2.6.27) reconoce formalmente el uso de medios enriquecidos aerobios y anaerobios con una incubación mínima de 7 días a 35º- 37°C como método de prueba alternativo (en el caso de *Cutibacterium acnes*, el tiempo de detección puede ser mayor). Este acortamiento en el tiempo es de suma importancia debido al estado crítico del paciente y la corta vida útil del producto. Un estudio publicado por la FDA en 2011 demostró que la detección de crecimiento por tecnología de bioluminiscencia ATP (Rapid Milliflex sistema de detección) o sistemas de monitoreo de CO<sub>2</sub> (Bactec y BacT/Alert) eran alternativas adecuadas a la detección de turbidez<sup>2</sup>. A día de hoy, el sistema automatizado de hemocultivos BACT/ALERT®3D (utilizado en la práctica clínica) y BACT/ALERT®3D DUAL-T (utilizado en la industria), son los equipos que mejor han demostrado cumplir con las especificaciones definidas en la



Farmacopea mediante la utilización de unos frascos específicos de uso industrial (BacT-ALERTiAST y BacTALERTiNST, ([https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/Colegios\\_de\\_Especialidade/eventos/IF/2019/RACI\\_2019/apresentacoes/Increase\\_Productivity\\_Rapid\\_Micro\\_Methods\\_PharmaEnvironment\\_Michael\\_Wasmann.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/Colegios_de_Especialidade/eventos/IF/2019/RACI_2019/apresentacoes/Increase_Productivity_Rapid_Micro_Methods_PharmaEnvironment_Michael_Wasmann.pdf)) para la realización de controles en las muestras de terapia celular <sup>3</sup>. Estos frascos no son aptos para utilizar en el sistema automatizado VIRTUO (bioMérieux) ya que los algoritmos de detección de los que dispone VIRTUO no están validados para este tipo de muestras.

En referencia al sistema automatizado BACTEC, hay publicaciones con resultados dispares <sup>2,3,4</sup>. No obstante, no debe olvidarse la necesidad de validar cualquiera de los métodos elegidos para realizar el ensayo en todos los tipos de productos a estudiar.

El control microbiológico de productos celulares debe llevarse a cabo en condiciones de asepsia, siguiendo las disposiciones vigentes para materiales potencialmente infecciosos, pero sin aplicar ningún procedimiento que pueda limitar la detección de microorganismos presentes en los mismos. El ensayo debe realizarse en condiciones vigiladas regularmente por toma de muestras adecuadas en la zona de trabajo y por controles apropiados.

## 5.1. TIPOS DE PREPARADOS

Se procesará una muestra representativa de los derivados terapéuticos fabricados (células madre u otros). Cuando la naturaleza del producto no permita realizar el ensayo directamente sobre la muestra, este puede realizarse sobre soluciones de cultivo, lavado o transporte. Los ensayos de esterilidad se pueden realizar en diferentes fases del proceso de producción:

- Ensayo de esterilidad durante la producción: se inocularán los medios de cultivo con una muestra representativa del cultivo o cultivos celulares según se defina en el análisis de riesgos y puntos críticos de cada producto. La finalidad de este ensayo es conocer el resultado antes de la liberación del producto.
- Ensayo de esterilidad en el producto terminado: para controlar una posible contaminación al final del procedimiento, es aceptable realizar un cribado con técnicas rápidas (tinciones) dirigidas a detectar la presencia de hongos y bacterias. Puesto que los productos de terapia celular son de vida media corta, el resultado no se obtendrá antes de la liberación del producto. La certificación y liberación del medicamento puede hacerse en 2 fases, antes y después de obtener los resultados de todos los ensayos.

## 5.2. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

El personal de producción de las salas será el responsable de tomar las muestras y entregarlas al responsable de control de calidad para la realización del ensayo. Utilizando material estéril, se inocularán medios de cultivo adecuados para la detección de bacterias y hongos.

En la actualidad, se recomienda el uso de dos frascos de hemocultivo, uno anaerobio y otro aerobio, que se procesarán en incubadores de lectura automatizada. En caso de que el volumen de muestra disponible no sea suficiente para inocular adecuadamente ambos frascos de hemocultivo, se inoculará primero el frasco aerobio con la cantidad necesaria y el resto se utilizará para el cultivo en frasco de anaerobiosis. La utilización de frascos pediátricos es preferible para el cultivo de volúmenes de muestra inferiores a 5 ml, por lo que se recomienda utilizarlos en lugar de los frascos aerobios estándar.

Para los productos hematopoyéticos, la cantidad mínima de producto a analizar en función del volumen final del producto es la que sigue:

Volumen total del producto (mililitros)	Volumen del inóculo
$V \geq 10$	1 por ciento del volumen total
$1 \leq V < 10$	100 microlitros
$V < 1$	No aplicable

En caso de que requiera dilución antes de la congelación, debe aumentarse el volumen del inóculo según el factor de dilución. Para otros productos celulares, las cantidades mínimas adecuadas se definen en términos de volumen o de número de dosis con un volumen mínimo aconsejable de 1 ml por frasco. Volúmenes inferiores deben justificarse y validarse previamente.

Adicionalmente se entregará una muestra de producto final en recipiente estéril para realizar tinciones directas de bacterias y hongos. Este procedimiento permite una liberación temprana del lote en los productos de vida media corta. El responsable del procedimiento debe asegurarse de la correcta identificación de los frascos y recipientes con muestras.

### 5.3. FRECUENCIA DEL MUESTREO

Todos los lotes de producto fabricado en las salas de producción deben someterse a los controles de calidad, pudiendo llevarse a cabo en el mismo centro o en laboratorios de referencia. En cualquier caso, se seguirá el plan de calidad establecido en el centro de producción.

### 5.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras inoculadas en frascos de hemocultivo o recipiente estéril, serán transportadas al laboratorio de Microbiología a la mayor brevedad posible. Si se va a retrasar la inoculación de la muestra en los medios de cultivo, ésta debe conservarse a  $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , para evitar que los microorganismos que pudiera haber en la muestra sean fagocitados por células presentes en algunos productos celulares, por ejemplo, neutrófilos. En caso de que los frascos de hemocultivo, una vez inoculados, no puedan introducirse en el incubador, deben mantenerse a una temperatura de entre  $15^{\circ}\text{-}20^{\circ}\text{C}$ , por un tiempo no superior a 12 horas. Si se supera este límite de tiempo, se deben realizar subcultivos de salida.

### 5.5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA, MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

La normativa vigente indica que deben usarse al menos 2 medios de cultivo adecuados para hongos y bacterias aerobias y anaerobias. En la actualidad, como se ha comentado, se aconseja utilizar frascos de hemocultivo para sistemas de monitorización continua que pueden disminuir el tiempo de detección a  $\geq 7$  días en lugar de los 14 necesarios utilizando medios sin lectura automatizada (USP 1071 [https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M12457\\_02\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M12457_02_01.html)). Estos contienen caldo digerido de soja y caseína enriquecido. Una vez en el laboratorio de Microbiología, se introducen los frascos en el incubador a  $35^{\circ}\text{-}37^{\circ}\text{C}$ , con un protocolo no inferior a 7 días. Si se realiza el test utilizando medios de cultivo sin lectura automatizada, hay que efectuar la inspección visual de turbidez del medio diariamente, durante el tiempo de incubación, que debe alargarse en este caso hasta los 14 días. Los cultivos no automatizados deben examinarse como mínimo una vez al día hasta la finalización del periodo de incubación. Para el subcultivo de frascos marcados como positivos o medios líquidos donde se observe turbidez, se utilizarán medios sólidos adecuados, enriquecidos y/o diferenciales (agar sangre, agar chocolate, MacConkey). Las muestras para tinciones de hongos y bacterias se procesarán según el protocolo general de las tinciones elegidas. Se recomienda realizar la tinción de Gram para el despistaje de bacterias y la tinción de calcoflúor para hongos.

### 5.6. CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN E INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las tinciones se informarán cuando estén disponibles indicando si se observan formas compatibles con la presencia microorganismos. En medios líquidos, si no se observa turbidez al finalizar el periodo de incubación, se informará como cultivo negativo. En el caso de la utilización de frascos de hemocultivos, debe realizarse una inspección visual de los mismos al final de la incubación para descartar la presencia de hongos filamentosos no detectados por el instrumento.

Si se obtiene crecimiento, se informará como cultivo positivo, realizando identificación a nivel de especie y antibiograma mediante la metodología de rutina del laboratorio de microbiología. En función de la especie de microorganismo aislado, los responsables de la Unidad de Terapia Celular decidirán, según los protocolos establecidos, si es posible continuar el tratamiento del paciente o por el contrario debe descartarse el producto<sup>5</sup>.

Habitualmente, la presencia de microorganismos de la piel (estafilococos coagulasa negativa, estreptococos del grupo *viridans*) conlleva el análisis microbiológico de una segunda alícuota del producto celular, para confirmar que el origen del microorganismo se encuentra en la muestra y no en una inadecuada manipulación de la misma en el momento de la inoculación de los medios. En muchas ocasiones se continúa con la terapia celular administrando cobertura antibiótica al paciente. Por el contrario, la presencia de enterobacterias y en general, bacterias u hongos considerados virulentos, da lugar a la no conformidad del producto y la suspensión del tratamiento.

## 5.7. REGISTROS

Los centros están obligados a mantener un sistema de trazabilidad de todos los productos, incluidas las materias primas que se han utilizado y cualquier material que haya estado en contacto con los productos celulares. El centro hospitalario debe conservar los datos durante un periodo de tiempo de 30 años tras la fecha de caducidad del producto. La farmacovigilancia también será responsabilidad del hospital que tiene la autorización de uso y deberán hacer informes periódicos de seguridad a la AEMPS.

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

## 5.8. ENSAYO DE DETECCIÓN DE MICOPLASMAS

La contaminación de los cultivos celulares con micoplasmas es un problema relativamente frecuente y subestimado por la dificultad que conlleva su detección. El origen puede estar en las células de partida, sueros no tratados de origen humano o animal o en el personal que trabaja los cultivos celulares. Los micoplasmas pueden atravesar los filtros con tamaño de poro menor de 0,2 micras que se utilizan para la esterilización con membrana. Además, son resistentes a los antibióticos que actúan a nivel de la pared celular, pues carecen de ella, y no son completamente eliminados por muchos otros antibióticos de amplio espectro que simplemente inhiben su proliferación. Los signos visibles de contaminación, como la turbidez o las variaciones de pH, son infrecuentes, pero se pueden producir cambios como desaceleración de la tasa de crecimiento celular, propiedades inmunológicas alteradas y cambios metabólicos y de la expresión génica que afectan a la calidad y funcionalidad de las células. La sección 2.6.7 MICOPLASMAS, de la Real Farmacopea Española, indica que puede llevarse a cabo el control de micoplasmas mediante diferentes técnicas: 1) método por cultivo, 2) método por cultivo de células indicadoras o bien por 3) técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), como alternativa a alguno de los dos primeros métodos, tras realizar la validación de las mismas.

### a) Tipos de preparados

Todos los productos de terapia celular en fase final, previamente a su liberación, deben ser sometidos al ensayo de detección de micoplasmas.

### b) Recogida de muestras

Se realizará siguiendo el mismo procedimiento indicado para el control bacteriano y fúngico descrito previamente, utilizando un recipiente estéril.

### c) Frecuencia del muestreo

Los procedimientos descritos a continuación aplican a todos los productos de terapia celular fabricados en centros hospitalarios, debiendo realizarse antes de la liberación del producto final.

### d) Transporte y conservación de la muestra

Las muestras de producto final deben transportarse en recipiente estéril y a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología sin demora. Es aconsejable avisar al responsable del laboratorio con antelación de la fecha y hora estimada en la que se van a realizar los ensayos.

### e) Procesamiento de la muestra, medios de cultivo y condiciones de incubación

#### 1) Método por cultivo

El crecimiento fastidioso de los micoplasmas, la necesidad de medios de cultivo complejos y escasamente comercializados, el largo periodo de incubación, junto a la baja sensibilidad de la técnica, hace que el cultivo sea de poca utilidad. En la actualidad, la determinación de micoplasmas se lleva a cabo habitualmente mediante

técnicas de TAAN. No obstante, en el capítulo 2.6.7 de la Real Farmacopea Española, pueden consultarse de forma específica los requisitos detallados para la realización del cultivo.

Puede utilizarse cualquier medio de cultivo indicado para el crecimiento de micoplasmas, siempre que se haya evaluado, en cada lote, la capacidad del mismo para permitir el crecimiento de los micoplasmas, tanto en presencia como en ausencia del producto a ensayar. Los medios de cultivo recomendados en la Farmacopea Europea son: medio Hayflick (recomendado para la detección de micoplasmas en general), medio Frey (recomendado para la detección de *Mycoplasma synoviae*) y medio Friis (micoplasmas no aviares). Debe incluirse un control positivo de al menos una de las siguientes cepas de referencia:

<i>A. laidlawii</i>	NCTC 10116	CIP 75.27	ATCC 23206
<i>M. gallisepticum</i>	NCTC 10115	CIP 104967	ATCC 19610
<i>M. fermentans</i>	NCTC 10117	CIP 105680	ATCC 19989
<i>M. hyorhinis</i>	NCTC 10130	CIP 104968	ATCC 17981
<i>M. orale</i>	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714
<i>M. pneumoniae</i>	NCTC 10119	CIP 103766	ATCC 15531
<i>M. synoviae</i>	NCTC 10124	CIP 104970	ATCC 25204

En cada lote de medio de cultivo que se vaya a utilizar, habrá que llevar a cabo el ensayo para determinar las propiedades nutritivas del medio, según la metodología descrita a continuación.

#### a) Propiedades nutritivas

Se realizará el ensayo para determinar las propiedades nutritivas en cada nuevo lote de medio. Para ello, hay que sembrar en los medios elegidos las cepas patrón adecuadas, utilizando como máximo 100 UFC por placa de 60 mm de diámetro que contenga 9 mL de medio sólido y por envase de 100 mL de medio líquido. Para cada especie de microorganismo, se utilizará una placa y envase distinto. Posteriormente se incuban los medios y se realizan subcultivos de 0,2 mL de medio líquido al medio sólido a intervalos específicos según se describe en el siguiente punto “ensayo de detección de micoplasmas en el producto a examinar”. El medio sólido satisface el ensayo si se observa crecimiento adecuado para cada microorganismo de ensayo (el crecimiento obtenido no difiere en un factor superior a 5 del valor calculado para el inóculo). El medio líquido satisface el ensayo si se observa crecimiento sobre placas de agar subcultivadas en el caldo en al menos 1 subcultivo de cada microorganismo de ensayo.

Se debe realizar además un ensayo de sustancias inhibitorias una sola vez por cada tipo de producto y sólo se repetirá si se produce algún cambio en la metodología de producción que pueda afectar a la detección de micoplasmas. Este se lleva a cabo mediante la realización de un ensayo de propiedades nutritivas en presencia y ausencia del producto a examinar (sección 2.6.7 de la Real Farmacopea Española).

#### b) Ensayo para la detección de micoplasmas en el producto a analizar

Se sembrarán las muestras a examinar en medios de cultivo líquidos y sólidos. Sembrar 10 mL del producto a examinar en 100 mL del medio de cultivo líquido. Si el pH del medio cambia significativamente, se restablece por adición de una disolución de hidróxido de sodio o de ácido clorhídrico. Sembrar 0,2 mL del producto a examinar en las placas de medio sólido. Como controles negativos se utilizarán placas de medio sólido y un volumen de 100 mL del medio líquido y sin inocular. Incubar los medios líquidos en envases herméticos a 35°-38°C y los medios sólidos en microaerofilia a 35°-38°C. Los medios líquidos se incuban durante 21 días. Entre los días 2-4 después de la siembra, hay que realizar un subcultivo de cada medio líquido sembrando 0,2 mL en al menos 1 placa de cada medio sólido con el fin de tener más de un subcultivo por si se produjera contaminación por otros microorganismos. Hay que repetir el procedimiento entre los días 6° y 8°, entre los días 13° y 15° y, finalmente, entre los días 19° y 21° del ensayo. Todos los medios sólidos se incuban durante 14 días, excepto los del último subcultivo (días 19-21), que se incubarán 7 días.

Es necesario incluir en el ensayo controles positivos sembrando como máximo 100 UFC de al menos 1 microorganismo de ensayo en medio sólido o medio líquido. Se recomienda usar los microorganismos de ensayo en rotaciones regulares.

### c) Criterios de interpretación de los resultados

Observar los medios líquidos cada 2-3 días y si se advierte un cambio de color realizar un subcultivo a medio sólido. El ensayo es válido si se puede leer al menos 1 placa por medio y por día de siembra. Examinar al microscopio los medios sólidos una vez concluido el periodo de incubación. El producto satisface el ensayo si no se observa crecimiento de colonias compatibles con micoplasmas.

Si un medio líquido presenta contaminación bacteriana o fúngica, el ensayo no es válido. Tampoco es válido si uno o más de los controles positivos no presentan crecimiento de micoplasmas en al menos una placa de subcultivo. El ensayo no es válido si uno o más de los controles negativos presentan crecimiento de micoplasmas. Si se observan colonias sospechosas, se debe realizar la identificación por una metodología previamente validada.

## 2) Método por cultivo de células indicadoras

Este método requiere realizar cultivos celulares de micoplasmas por lo que queda restringido a laboratorios especializados. Brevemente, consiste en teñir los cultivos celulares con un colorante fluorescente que se une al ADN. Los micoplasmas se detectan por el aspecto característico en partículas o en filamentos, de la fluorescencia observada en la superficie de las células. Se utilizan células Vero u otras con capacidad similar para el cultivo de micoplasmas. Los procedimientos específicos están disponibles para su consulta en la sección 2.6.7 de la Real Farmacopea Española.

## 3) Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos pueden aplicarse en lugar del método por cultivo y el método por cultivo de células indicadoras y cuando así lo indique la monografía. Cuando son positivas, indican la presencia de una secuencia nucleotídica particular y no necesariamente la presencia de micoplasmas viables. La PCR en tiempo real es un método sensible y específico para detectar la presencia de ADN de micoplasmas en el sobrenadante de los cultivos celulares. Es necesario, como en otros casos, llevar a cabo la validación del método antes de ponerlo en marcha o bien adquirir un *kit* comercial validado según Farmacopea Europea (punto 2.6.7). Cuando se utilice un *kit* comercial, ciertas partes de la validación pueden haberse llevado a cabo por la casa comercial, pero debe tenerse en cuenta que es posible que la información a este respecto no sea accesible en su totalidad.

Como ejemplo de *kit* comercial validado por Farmacopea Europea expondremos brevemente la tecnología de los productos de Minerva Biolabs (Berlín, Alemania), Venor®GeM. Se trata de *kits* de PCR que amplifican la región codificante del ARNr 16S del genoma del micoplasma. La detección puede llevarse a cabo, bien mediante electroforesis en gel (*kit* de PCR convencional a punto final) o a tiempo real mediante sondas fluorescentes (PCR a tiempo real). Incluyen, además, un control de amplificación interno y control positivo. Puesto que detecta la presencia de ARN, no requiere la presencia de microorganismos viables. El *kit* contiene dUTP en lugar de dTTP, para facilitar la degradación de los amplicones mediante el uso de uracil-ADN glicosilasas (UNG), reduciendo la posibilidad de contaminación y falsos positivos. Las muestras deben recogerse cuando los cultivos celulares alcancen una confluencia del 80-90%. El sobrenadante del cultivo es una muestra adecuada que no requiere ninguna manipulación adicional. En caso de que se inhiba el proceso de amplificación por presencia de sustancias indeseadas en el medio, puede llevarse a cabo una extracción de ADN previa. Será necesaria una extracción de ADN cuando se utilicen muestras como vacunas, *pellets* celulares, suero fetal bovino o muestras en parafina. De igual manera, para cumplir con los estándares de farmacopea, se llevará a cabo previamente la extracción de ADN de la muestra. Los títulos de micoplasma en el medio de cultivo suelen estar en torno a  $10^6$  partículas por ml, con un máximo de  $10^8$  partículas, lo que ofrece suficiente cantidad de ADN en el sobrenadante para los límites de detección del método.

Los protocolos detallados de trabajo de los diferentes *kits* disponibles pueden consultarse en la página web del fabricante (<https://minerva-biolabs.com/en/mycoplasma-detection-kits>).



## 6. MÉTODOS DE CONTROL NO BASADOS EN LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE CULTIVO BACTERIANO Y FÚNGICO

En la sección 5.1.6. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA de la Real Farmacopea Española, se detallan un grupo de métodos alternativos para el control de la calidad microbiológica, que son, en general, más rápidos que los tradicionales basados en el cultivo. Algunos de ellos proporcionan resultados en tiempo real, permitiendo la instauración precoz de acciones de corrección. La aplicación de cualquiera de estos métodos lleva aparejada la necesidad de validación del mismo previamente a su puesta en marcha. La validación tiene dos fases:

- Validación primaria: la realiza el fabricante que suministra el método.
- Validación para uso específico: la realiza el laboratorio en los productos a ensayar.

Por otro lado, también será necesario que el laboratorio compruebe la idoneidad del ensayo en los productos a analizar, cada vez que se modifique el protocolo del ensayo y cuando se introduzcan productos nuevos en el análisis. Las consideraciones generales para la validación de métodos alternativos, ventajas, inconvenientes de cada técnica y usos potenciales de las mismas, se describen con detalle en la citada sección 5.1.6.

Como se ha mencionado anteriormente, hay otros ensayos que generalmente son llevados a cabo fuera del ámbito del laboratorio de microbiología: análisis de endotoxinas, análisis de fenotipo mediante citometría de flujo, de viabilidad, citogenético. En los apartados anteriores se ha descrito de forma minuciosa los métodos más comúnmente utilizados para el control de esterilidad de los diferentes productos. En este apartado, se hará mención a algunos procedimientos que, si bien no están al alcance de todos los laboratorios de microbiología, son en muchos casos necesarios para un correcto control de aquellos productos destinados a terapias de más impacto clínico.

### 6.1. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (TAAN)

Entre los ensayos de identificación, destacan en la actualidad las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). Las técnicas de TAAN se basan en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que conduce a un aumento exponencial de un fragmento del ácido nucleico, seleccionado previamente, mediante el uso de iniciadores específicos. Se puede amplificar ADN o bien ARN, previa transcripción del mismo a ADNc utilizando transcriptasa inversa (RT-PCR). Otras técnicas específicas para amplificar ARN son NASBA (amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos) y TMA (amplificación mediada por transcripción). La detección del producto amplificado puede realizarse por diferentes metodologías, como hibridación por sondas fluorescentes, análisis del tamaño de fragmentos, de las secuencias, etc. Las TAAN pueden ser técnicas cualitativas (indican presencia o ausencia), semicuantitativa o cuantitativa (estiman la cantidad inicial de molécula diana). Para identificación/caracterización también puede analizarse la secuencia de regiones específicas del genoma (ARNr 16S o 23S).

Algunas de las ventajas adicionales que presentan estos métodos son: escaso volumen de muestra necesario para realizar el ensayo y una elevada sensibilidad y especificidad. Por otro lado, los procedimientos son sensibles a la contaminación cruzada, por lo que habrá de extremar las condiciones de limpieza para llevarlas a cabo, asegurando la completa eliminación de la presencia de fragmentos de ácidos nucleicos.

Dada su alta especificidad, se utilizan habitualmente en el control de esterilidad de preparados celulares, para el control de esterilidad de preparados celulares o para la detección de ciertos microorganismos, como los micoplasmas. Para estimar el recuento, es necesario recurrir a la PCR cuantitativa en tiempo real.

El papel de la biología molecular en el procedimiento que nos ocupa, también es extensible para demostrar que un microorganismo aislado del producto examinado es idéntico a un microorganismo aislado del material o del medio ambiente relacionado con el ensayo mediante tipado molecular basado en la homología ARN/ADN.

## 6.2. ENDOTOXINAS

Las endotoxinas de bacterias Gram-negativas son la causa más frecuente de reacciones tóxicas debidas a la contaminación de productos farmacéuticos con pirógenos. Su actividad pirógena es mucho mayor que la de la mayoría de otras sustancias pirógenas. El ensayo de endotoxinas bacterianas (EEB) se utiliza para detectar o cuantificar endotoxinas procedentes de bacterias Gram-negativas utilizando el lisado de amebocitos del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). La presencia de endotoxinas en un producto puede estar enmascarada por factores que interfieren con la reacción entre éstas y el lisado de amebocitos por lo que se debe demostrar que el EEB es válido el producto considerado. Por lo tanto, esto puede implicar la detección y eliminación de factores de interferencia por un procedimiento adecuado. El EEB puede realizarse por tres técnicas: gelificación, turbidimetría y colorimetría. Un dato importante para la realización de esta técnica, es el tipo de agua que se debe utilizar para preparar la composición de los reactivos. Debe aplicarse la que se utiliza para realizar las preparaciones inyectables o, en su defecto, aquella producida por otro procedimiento que no reaccione con el lisado utilizado en el límite de detección de la técnica. La información necesaria se debe solicitar a los fabricantes que deben proporcionar todos los datos de validación que se refieren a la aplicabilidad del EEB a las sustancias y formulaciones de interés. Estos datos incluyen detalles de la preparación de la muestra y de cualquier procedimiento necesario para eliminar los factores de interferencia. En las secciones 2.6.14 (ENDOTOXINAS BACTERIANAS) Y 5.1.10 (INDICACIONES PARA LA APLICACIÓN DEL ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS) de la Real Farmacopea Española, vienen desarrollados todos los aspectos relacionados con el EEB.

Actualmente existe en el mercado un método colorimétrico tipo *point of care*. Se trata de un sistema de cinética cromogénica que mide la intensidad de color que está relacionada directamente con la concentración de endotoxina en la muestra y es capaz de proporcionar resultados cuantitativos en 15 minutos. Emplea reactivos LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*) contenidos en cartuchos que contienen niveles exactos de reactivo, sustrato cromogénico y control estándar de endotoxina; los cartuchos están aprobados por la FDA; este equipo funciona con un *software* propio de la marca Charles River que permite la medición de la endotoxina. Existen cartuchos con diferentes niveles de sensibilidad (<https://www.criver.com/products-services/qc-microbial-solutions/endotoxin-testing/endotoxin-testing-systems/endosafe-nexgen-pts?region=3661>).

## 6.3 SEGURIDAD VIRAL

Este apartado proporciona las indicaciones generales referentes a la seguridad viral de los medicamentos cuya fabricación ha implicado el uso de materiales de origen humano o animal (Consultar sección 5.1.7 SEGURIDAD VIRAL de la Real Farmacopea Española).

El principio de la evaluación del riesgo, es considerar diversos factores que puedan influir en el nivel potencial de partículas infecciosas en el medicamento y los factores relacionados con el uso del medicamento que determinen o influyan en el riesgo viral para los pacientes.

La evaluación del riesgo debe tomar en consideración los siguientes aspectos:

- Las especies de origen.
- El órgano, el tejido y el fluido de origen.
- Los posibles contaminantes debidos al origen de la materia prima y los antecedentes del donante o donantes, preferiblemente los datos epidemiológicos.
- Los posibles contaminantes resultantes del proceso de fabricación (por ejemplo, procedentes de los materiales de riesgo usados en la fabricación).
- La infectividad y patogenicidad de los posibles contaminantes para los pacientes a los que está destinado el medicamento, teniendo en cuenta la vía de administración del medicamento.
- La cantidad de material utilizado para producir una dosis de medicamento.
- Los controles efectuados al donante o donantes, a la materia prima, durante la producción y al producto final.
- El proceso de fabricación del producto y su capacidad para eliminar o inactivar los virus.

En el caso concreto de los MTA y para los productos derivados del plasma humano en la terapia alogénica, es imperativo realizar la PCR frente a VIH, VHB y VHC, para el control de materia de partida. Así mismo, son de aplicación ensayos para detectar contaminación viral general como técnicas de hemaglutinación y hemoadsorción. ([https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx\\_6445\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx_6445_es.pdf) y [https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/eventos/medicamentos-uso-humano/2010/docs/terapias-Avanzadas\\_marzo-2010/ponencias/Estructura\\_Calidad\\_S.Rojo\\_M.Timon.pdf?x72238](https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/eventos/medicamentos-uso-humano/2010/docs/terapias-Avanzadas_marzo-2010/ponencias/Estructura_Calidad_S.Rojo_M.Timon.pdf?x72238)).

En la actualidad, gracias a los procedimientos de inactivación/eliminación, los medicamentos derivados de plasma ofrecen una seguridad excelente con respecto a los virus con envoltura (VIH, VHB, VHC). Sin embargo, virus sin envoltura, como puede ser el caso de VHA y parvovirus B19, son más difíciles de inactivar por lo que debe considerarse su presencia cuando haya factores de riesgo potencial de transmisión y, por tanto, considerar su detección en esos casos ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03_en.pdf)).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

### 7.1. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial. BOE núm. 144 de 14/06/2014
2. Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/normas-co-rrecta-fabricacion/nueva-guia-NCF-ATMPs.pdf>
3. Directriz Q5A de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH): Evaluación de la Seguridad Viral de los Productos Obtenidos por Biotecnología y Procedentes de Líneas Celulares de Origen Humano o Animal [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx\\_6445\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2003/200312016445/anx_6445_es.pdf)
4. Guía de Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
5. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
6. Guías PIC/S Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. <https://picscheme.org/en/publications>
7. Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products. Part I and Part II. Pharmaceutical Inspection Convention. Mayo 2021.
8. Guide to the Quality and Safety of Tissues and Cells for Human Application. 4th edition.
9. Note for Guidance on the Warning on Transmissible Agents in Summary of Product Characteristics (Spcs) and Package Leaflets for Plasma-Derived Medicinal Products (CPMP/BPWG/BWP/561703). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-warning-transmissible-agents-summary-product-characteristics-spcs-package-leaflets/bpwg/bwp/561/03_en.pdf)
10. Real Farmacopea Española 5ª edición. <https://extranet.boe.es/index.php?referer=/farmacopea/index.php>. Reglamento (CE) No 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 De Noviembre de 2007 Sobre Medicamentos de Terapia Avanzada y por el que se modifican La Directiva 2001/83/CE y El Reglamento (CE) no 726/2004 <https://www.boe.es/doue/2007/324/L00121-00137.pdf>

### 7.2. REFERENCIAS

1. Poveda Andrés JL, Valero García S. Fabricación de medicamentos de terapias avanzadas en los servicios de Farmacia Hospitalaria: ¿empezamos?. Rev. OFIL·ILAPHAR. 2021; 31(1):9-10. <https://dx.doi.org/10.4321/S1699-714X2021000100002>.
2. Gebo JET, Lau AF. Sterility testing for cellular therapies: what is the role of the clinical microbiology laboratory? J Clin Microbiol. 2020; 58(7):e01492-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01492-19>.



3. England MR, Stock F, Gebo JET, Frank KM, Lau AF. Comprehensive evaluation of compendial USP<71>, BacT/Alert Dual-T, and Bactec FX for detection of product sterility testing contaminants. *J Clin Microbiol*. 2019; 57(2):e01548-18. <https://doi.org/10.1128/JCM>
4. Hocquet, D, Sauget, M, Roussel S, Malugani C, Pouthier F, Morel P, et al. Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products. *Cytherapy*. 2014; 16: 692-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.005>
5. Schlaeter A, Ford B, Lau AF. Culture of blood and cellular therapy products in blood banking. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th Edition. Editor in chief, Amy L. Leber, 2022. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818814.ch13.5. ISBN 9781555818814

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéuticos	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

## PNT-CE-01

### Control de esterilidad de productos farmacéuticos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento para el control de la esterilidad de productos farmacéuticos elaborados en los Servicios de Farmacia Hospitalaria. Este ensayo se aplica a las sustancias, preparaciones o artículos que, según la farmacopea, deben ser estériles. Incluye el estudio de esterilidad de los medios de cultivo, el ensayo de fertilidad de dichos medios y el ensayo de idoneidad del método, que deben realizarse previamente al ensayo de esterilidad del producto farmacéutico a examinar.

## 2. FUNDAMENTO

**El ensayo de esterilidad** se aplicará a aquellas sustancias, preparaciones o artículos que según la farmacopea deben ser estériles. El objetivo del ensayo de esterilidad es proporcionar un control independiente para comprobar que un producto cumple con las exigencias de la Real Farmacopea Española (sección 2.6.1 ESTERILIDAD). Para llevarlo a cabo es necesario realizar previamente un control de los medios de cultivo para comprobar su esterilidad y propiedades nutritivas, además de un ensayo de idoneidad del método, que nos permitirá demostrar que el método microbiológico elegido para cada producto es adecuado, permitiendo el crecimiento de microorganismos patrón en nuestro producto y usando los medios de cultivo indicados.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Guías PIC/S *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products*
- Guía de Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria. Dirección General de Cartera Básica del Servicios del SNS y Farmacia. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. [https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP\\_JUNIO\\_2014\\_VF.pdf](https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)
- Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario. Anexo I: Fabricación de Medicamentos Estériles. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. <https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/>
- Real Farmacopea Española 5ª edición. <https://extranet.boe.es/farmacopea/>

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición, o la petición electrónica que acompaña a cada muestra, debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente:

- Datos demográficos y de la muestra (fecha de obtención de la muestra, tipo de producto, fecha de preparación, número de lote y similares), servicio de procedencia y datos del farmacéutico que realiza la petición.
- Es recomendable aportar información sobre la matriz de riesgo (elaborada por el Servicio de Farmacia al realizar la evaluación de los riesgos de las preparaciones).
- Determinaciones microbiológicas solicitadas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

## 4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Las muestras se recogerán en el lugar de preparación de los diferentes productos farmacéuticos (salas blancas o de ambiente controlado). Las Farmacias Hospitalarias enviarán el producto a estudio inoculado en los medios de cultivo proporcionados por los laboratorios de Microbiología.

- Para realizar el control de esterilidad, el número mínimo de unidades a examinar depende del tamaño del lote. Como es evidente, es imposible realizar un análisis de cada uno de los envases que forman parte de un lote, por lo que es necesario diseñar un plan de muestreo apropiado. Por este motivo se seleccionará un número determinado de unidades basándonos en la hipótesis de que el análisis del contenido de todos los envases del lote darán el mismo resultado. En el caso de producción en condiciones asépticas, se recomienda examinar muestras introducidas en los envases al principio y al final del lote y después de cualquier intervención significativa.

En la Tabla 1 se resumen el número mínimo de unidades a examinar según el tamaño del lote, atendiendo a las recomendaciones de la Real Farmacopea Española.

Tabla 1.- Número mínimo de unidades a examinar según el tamaño del lote

Tipo de preparación	Nº de unidades en el lote	Nº mínimo de unidades a examinar para cada medio
<b>Parenteral</b>	≤100 envases	El 10% de los envases, pero como mínimo 4
	100-500 envases	10 envases
	>500 envases	El 2% de los envases, pero como máximo 20 (en el caso de las preparaciones parenterales de gran volumen, como máximo 10 envases)
<b>Oftálmicas y otras preparaciones no inyectables</b>	≤200 envases	El 5% de los envases, pero como mínimo 2
	>200 envases	10 envases
	Si el producto se presenta en envases unidos, aplicar el esquema descrito anteriormente para las preparaciones de administración parenteral	

Por otra parte, según las recomendaciones de la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos en Servicios de Farmacia Hospitalaria* ([https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP\\_JUNIO\\_2014\\_VF.pdf](https://www.sefh.es/sefhpdfs/GuiaBPP_JUNIO_2014_VF.pdf)), se debe realizar un control microbiológico en todas aquellas preparaciones estériles compuestas por más de 25 unidades por lote. Este control se realizará una vez finalizada la preparación, pero antes de la liberación del lote.

## 4.3. FRECUENCIA DEL MUESTREO

El control microbiológico de esterilidad se realizará siempre tras la producción de un nuevo lote siguiendo las recomendaciones de muestro descritas anteriormente.

## 4.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El transporte de los medios de cultivo ya inoculados se realizará de forma inmediata en contenedores de transporte adecuado y a temperatura ambiente.

En general, las muestras se deben recibir en el laboratorio dentro de las 2 horas siguientes tras su recogida. Si

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

no se pueden lograr estos tiempos para el transporte, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente no más de 24 horas. Es importante enviar las muestras lo antes posible para su inmediata incubación, ya que no pueden conservarse en refrigeración.

Los contenedores con medio líquido se sellarán con film de plástico para evitar contaminaciones durante su traslado. Las muestras se enviarán al laboratorio de Microbiología perfectamente identificadas y se registrarán en el SIL para garantizar la trazabilidad dentro del laboratorio.

#### 4.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se considerarán incidencias relacionadas con la recepción de la muestra: el retraso en el transporte, la conservación defectuosa (temperatura inadecuada).

Se considerarán motivos de rechazo los siguientes:

- Muestras sin identificar y que no haya sido posible resolver la incidencia
- Muestras derramadas

### 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

#### 5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio líquido con tioglicolato
- Medio líquido con hidrolizado de caseína y soja (TSB)
- Medios sólidos generales (por ejemplo agar sangre, agar chocolate) y diferenciales para realizar subcultivos si fuera necesario aislar posibles microorganismos causantes de contaminación.

#### 5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Cepas patrón necesarias para el ensayo de fertilidad del medio y el ensayo de idoneidad del método

- Bacterias aerobias

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276

*Bacillus subtilis* ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275

- Bacterias anaerobias

*Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437, NBRC 14293

- Hongos

*Candida albicans* ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594

*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

Existen comercializadas cepas de referencia calibradas que consisten en bolas hidrosolubles que contienen el número preciso de microorganismos necesarios para llevar a cabo los ensayos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

## 6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Pinzas estériles
- Asas de siembra estériles
- Vórtex
- Estufa de aerobiosis a 20°-25°C
- Estufa de aerobiosis a 30°C-35°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Centrifuga
- Filtros estériles de 0,45 micras y sistema de filtración
- Sistema automatizado de identificación
- MALDI-TOF
- Otros sistemas de identificación

## 7. PROCESAMIENTO

Los medios de cultivo utilizados deben satisfacer los siguientes ensayos, efectuados antes del análisis del producto a examinar o en paralelo.

### 7.1. ESTERILIDAD

- Incubar muestras de los medios de cultivo durante 14 días. No se debe observar proliferación de microorganismos.
- Deberá efectuarse en ambos medios (caldo tioglicolato a 30-35°C y caldo de hidrolizado de caseína y soja a 20-25°C).

### 7.2. ENSAYO DE FERTILIDAD DEL MEDIO PARA BACTERIAS AEROBIAS Y ANAEROBIAS Y HONGOS

- Analizar cada lote de medio, ya sea adquirido listo para usar o preparado a partir de un medio deshidratado o de sus componentes. Las cepas de microorganismos adecuadas se indican en el punto 5.2 de este documento.
- Inocular muestras del caldo tioglicolato con un pequeño número (como máximo 100 UFC) de los siguientes microorganismos, utilizando una muestra diferente para cada una de las siguientes bacterias: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Incubar en aerobiosis a 30-35°C.
- Inocular muestras del medio con hidrolizado de caseína y de soja con un pequeño número (como máximo 100 UFC) de los siguientes microorganismos, utilizando una muestra diferente para cada uno de los siguientes microorganismos: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Incubar los medios sembrados con bacterias durante como máximo 3 días y los medios sembrados con hongos durante como máximo 5 días. Incubar en aerobiosis a 20-25°C.

### 7.3. ENSAYO DE IDONEIDAD DEL MÉTODO

El objetivo es comprobar que el producto es capaz de soportar el crecimiento de las cepas patrón. El test de idoneidad, consiste en realizar la misma metodología del ensayo de esterilidad del producto (ver punto 7.4 de este documento) con las siguientes modificaciones según la metodología utilizada:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

**a.Filtración a través de una membrana.** Transferir el contenido a analizar a una membrana filtrante; después añadir un inóculo que contenga como máximo 100 UFC a la porción final del diluyente estéril utilizado para enjuagar el filtro.

**b.Siembra directa.** Después de transferir el contenido de uno o varios envases del producto a estudiar al medio de cultivo, añadir un inóculo que contenga como máximo 100 UFC.

En ambos casos, utilizar los microorganismos descritos anteriormente en el ensayo de fertilidad del medio (apartado 7.2) para bacterias aerobias, anaerobias, y hongos. Realizar un ensayo de fertilidad que sirva de control positivo. Incubar los recipientes con los medios durante como máximo 5 días.

Si después de la incubación se observa una proliferación de los microorganismos inoculados (cepas patrón) evidente y comparable a la observada en el recipiente de control sin producto, se considera que el producto no tiene actividad antimicrobiana en las condiciones del ensayo o que dicha actividad se ha eliminado satisfactoriamente. El ensayo de esterilidad puede realizarse entonces sin otra modificación.

Por el contrario, si en presencia del producto a examinar no se observa una proliferación evidente y visualmente comparable a la observada en el recipiente de control sin producto, se considera que el producto tiene una actividad antimicrobiana que no se ha eliminado satisfactoriamente en las condiciones del ensayo. Modificar las condiciones para eliminar la actividad antimicrobiana y repetir el ensayo de idoneidad del método.

Este ensayo de idoneidad del método se efectúa:

- cuando el ensayo de esterilidad debe realizarse en un nuevo producto;
- cada vez que se realiza una modificación de las condiciones experimentales del ensayo.

El ensayo de idoneidad del método se puede realizar al mismo tiempo que el ensayo de esterilidad del producto a examinar.

## 7.4. ENSAYO DE ESTERILIDAD DEL PRODUCTO A EXAMINAR

Puede utilizarse la técnica de filtración a través de una membrana o de siembra directa del producto a examinar en el medio de cultivo. En ambos casos se incluyen controles negativos apropiados. La técnica de filtración a través de una membrana se utiliza siempre que la naturaleza del producto lo permita, es decir, para preparaciones acuosas filtrables, preparaciones alcohólicas u oleosas y preparaciones miscibles o solubles en disolventes acuosos u oleosos, siempre que estos disolventes no tengan un efecto antimicrobiano en las condiciones del ensayo.

### a. Filtración a través de una membrana.

Para la filtración por membrana, el producto (ya sea puro o en diluyente, según corresponda) se pasa a través de filtro con un tamaño nominal de poro de como máximo 0,45 µm y cuya eficacia para retener microorganismos se haya demostrado. Filtrar inmediatamente. Si el producto tiene propiedades antimicrobianas, el filtro se puede lavar al menos tres veces (pero no más de cinco veces por filtro) con 100 ml de un diluyente estéril seleccionado para ser utilizado en el ensayo de idoneidad del método (por ejemplo, una disolución neutra de 1 g/L de peptona de carne o de caseína).

El contenido a examinar puede ser transferido a una o varias membranas, pero utilizando siempre como mínimo las cantidades de producto a examinar prescritas en la Tabla 2:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

Tabla 2.- Cantidades de producto a utilizar para cada medio en el ensayo de esterilidad

Cantidad por envase	Cantidad mínima que se ha de utilizar para cada medio, salvo excepción justificada y autorizada
<b>LÍQUIDOS</b>	
Menos de 1 mL	El contenido total de cada envase
1-40 mL	La mitad del contenido de cada envase, pero como mínimo 1 mL
Más de 40 mL pero no más de 100 mL	20 mL
Más de 100 mL	El 10% del contenido del envase, pero como mínimo 20 mL
Líquidos antibióticos	1 mL
Preparaciones insolubles, cremas y pomadas que deben ponerse en suspensión o emulsionarse	Utilizar el contenido de cada envase de modo que se obtengan como mínimo 200 mg
<b>SÓLIDOS</b>	
Menos de 50 mg	El contenido total de cada envase
50 mg o más pero menos de 300 mg	La mitad del contenido de cada envase, pero como mínimo 50 mg
De 300 mg a 5 g	150 mg
Más de 5 g	500 mg
Catgut y otros hilos de sutura para uso veterinario	3 segmentos de hilo (cada uno de 30 cm de largo)

Cuando el contenido de un solo envase no sea suficiente para realizar estos ensayos, se puede utilizar el contenido de  $\geq 2$  envases para sembrar los distintos medios.

El filtro de membrana es entonces transferido a TSB a 20 a 25°C y caldo de tioglicolato a 30 a 35°C durante al menos 14 días. Si se ha utilizado una sola membrana, ésta puede ser cortada asépticamente en dos partes iguales y transferirlos a los medios de cultivo.

#### b. Siembra directa del medio de cultivo.

Transferir la cantidad de la preparación a examinar, indicada en la tabla 2, directamente al medio de cultivo; el volumen del producto utilizado no será superior al 10% del volumen del medio. Si el producto a examinar tiene actividad antimicrobiana, efectuar el ensayo después de haberla neutralizado con una sustancia neutralizante adecuada o bien por dilución con una cantidad suficiente de medio de cultivo. Cuando sea necesario examinar un volumen importante del producto, es preferible utilizar un medio de cultivo concentrado, preparado teniendo en cuenta la dilución posterior.

Líquidos oleosos: emplear medios suplementados con un emulsionante apropiado en concentración adecuada, determinada en el ensayo de idoneidad del método (ejemplo polisorbato 80).

Pomadas y cremas: preparar dilución de aproximadamente 1/10 emulsionando con el emulsionante seleccionado en un diluyente estéril adecuado, por ejemplo, una disolución neutra de 1 g/L de peptona de carne o de caseína. Transferir el producto diluido a un medio que no contenga emulsionante.

Incubar los medios sembrados durante como mínimo 14 días. Observar los cultivos varias veces durante el periodo de incubación. Agitar suavemente cada día los medios que contengan productos oleosos. No obstante, si se utiliza el medio líquido con tioglicolato para la detección de microorganismos anaerobios, reducir la agitación todo lo posible con el fin de mantener las condiciones anaeróbicas.



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los cultivos se examinarán diariamente hasta completar los 14 días de incubación. Si el producto a examinar enturbia el medio de modo que la presencia o ausencia de proliferación microbiana no puede evaluarse visualmente, 14 días después del comienzo de la incubación, transferir muestras del medio (cada una como mínimo de 1 mL) a otros recipientes que contengan el mismo medio fresco e incubar a continuación los recipientes iniciales y los nuevos durante como mínimo 4 días.

Si a los 14 días no se observa turbidez en el medio el producto analizado satisface el ensayo de esterilidad. Por el contrario, si en este periodo se detecta turbidez en el medio se realizará un subcultivo en medios sólidos generales (por ejemplo, agar sangre o agar chocolate) y diferenciales que se incubarán durante 48-72 horas. Las colonias de bacterias y/o hongos recuperadas de estos medios se identificarán a nivel de especie mediante las técnicas microbiológicas rutinarias (por ejemplo, MALDI-TOF). En este caso el producto no satisface el ensayo de esterilidad y el cultivo se debe informar como positivo indicando la especie o especies identificadas. No es necesaria la realización rutinaria de antibiogramas de las especies recuperadas de estos cultivos.

Ante un ensayo de esterilidad en el que se observa proliferación microbiana, habría que considerar revisar los siguientes puntos:

- Los resultados del control microbiológico de las instalaciones donde se realizan los ensayos de esterilidad no son satisfactorios
- La evaluación del procedimiento experimental utilizado para efectuar el ensayo en cuestión pone de manifiesto algún problema.
- Se observa proliferación microbiana en los controles negativos
- Después de la identificación de los microorganismos aislados en el ensayo, el crecimiento de esta o estas especies puede atribuirse inequívocamente a problemas relacionados con los materiales y/o las técnicas utilizados en el ensayo de esterilidad.

Cuando el ensayo se declara inválido, se debe repetir con el mismo número de unidades que se utilizaron en el ensayo inicial. Si en este caso en el ensayo de esterilidad no se detecta crecimiento bacteriano se considera que el producto satisface el ensayo de esterilidad. Por el contrario, si en la repetición del ensayo se vuelve a detectar crecimiento microbiano, el producto a examinar no satisface el ensayo de esterilidad.

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

## 9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

- El personal técnico es responsable de la realización de los procedimientos microbiológicos de identificación, así como del registro de resultados.
- El personal facultativo es responsable de la supervisión de la técnica, supervisión de la lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de productos farmacéutico	PNT-CE-01	
		Edición Nº 01	Página 9 de 9

- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante (habitualmente Farmacia)
- Es responsabilidad del laboratorio de Microbiología poner a disposición de las áreas clínicas, donde habitualmente se recogen las muestras, los medios de cultivo y otros materiales para su inoculación y transporte, así como informar del modo de conservación de los medios de cultivo.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

En las preparaciones estériles todo crecimiento microbiano debe ser investigado y documentado en un informe de desviaciones por escrito. Los registros de trabajo han de conservarse un periodo de tiempo suficiente que satisfaga los requisitos legales. En cualquier caso, los registros se deben conservar al menos un año tras la fecha de caducidad del producto terminado. Los procedimientos y las instrucciones de trabajo (incluidas las prescripciones) deben conservarse al menos durante cinco años tras su empleo.

Los documentos en que se detalle el trabajo realizado (cuadernos, hojas de cálculo), informes parciales, finales y la información que se genere a partir de los datos brutos, debe quedar igualmente archivada y accesible.

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un resultado satisfactorio en el ensayo de esterilidad de un producto farmacéutico solo significa que no se han encontrado microorganismos en la muestra examinada en las condiciones del ensayo.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Ver documentos de consulta

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

## PNT-CE-02

### Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir el procedimiento para llevar a cabo el control microbiológico (bacterias y hongos) de los productos celulares que se procesan en salas blancas hospitalarias (productos de terapia celular y derivados hematopoyéticos).

## 2. FUNDAMENTO

Los derivados hematopoyéticos y los medicamentos de terapia celular son productos habitualmente procesados en las salas blancas de los recintos hospitalarios, y que requieren de un estricto control de esterilidad antes de administrarlos a los pacientes. Los productos de terapia celular son preparados celulares obtenidos mediante cultivo y modificación de células de médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical, principalmente.

Durante estos procedimientos puede producirse la contaminación bacteriana y fúngica de los preparados celulares, por lo que resulta imprescindible llevar a cabo un control de la esterilidad de los mismos antes de su liberación para administrarlos a pacientes. En este documento se describen las técnicas para realizar los ensayos englobados en el llamado "control microbiológico de productos celulares" (sección 2.6.27 de la Farmacopea).

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Capítulo 2.6.27 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS CELULARES de la Real Farmacopea Española . <https://extranet.boe.es/farmacopea/>
- Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHNP/410869/2006. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf)

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición, o la petición electrónica que acompaña a cada muestra, debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente:

- Datos demográficos y de la muestra (fecha de obtención de la muestra, tipo de producto, fecha de preparación, número de lote y similares), servicio de procedencia y datos del facultativo que realiza la petición.
- Determinaciones microbiológicas solicitadas.

### 4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben ser representativas de los derivados terapéuticos fabricados (células madre u otros). Se acepta el cultivo de soluciones de cultivo, lavado o transporte, cuando esté indicado. Los ensayos se realizan en diferentes fases del proceso de producción:

- Ensayo de esterilidad durante la producción: se inocularán los medios de cultivo con una muestra representativa del cultivo o cultivos celulares según se defina en el análisis de riesgos y puntos críticos de cada producto. La finalidad de este ensayo es conocer el resultado antes de la liberación del producto.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- Ensayo de esterilidad en el producto terminado: para controlar una posible contaminación al final del procedimiento, es aceptable realizar un cribado con técnicas rápidas (tinciones) dirigidas a detectar la presencia de hongos y bacterias. Puesto que los productos de terapia celular son de vida media corta, el resultado no se obtendrá antes de la liberación del producto. La certificación y liberación del medicamento puede hacerse en 2 fases, antes y después de obtener los resultados de todos los ensayos.

El personal de producción de las salas será el responsable de tomar las muestras y entregarlas al responsable de control de calidad para la realización del ensayo. Utilizando material estéril, se inocularán los medios de cultivo adecuados para la detección de bacterias y hongos. En la actualidad, se recomienda el uso de dos frascos de hemocultivo, uno anaerobio y otro aerobio, que se procesarán en incubadores de lectura automatizada. Si el volumen de muestra disponible no es suficiente para inocular adecuadamente ambos frascos de hemocultivo, se inoculará primero el frasco aerobio con la cantidad necesaria y el resto se utilizará para el cultivo en frasco de anaerobiosis. La utilización de frascos pediátricos es preferible para el cultivo de volúmenes de muestra inferiores a 5 ml, por lo que se recomienda utilizarlos en lugar de los frascos aerobios estándar.

Para los productos hematopoyéticos la cantidad mínima de producto a analizar en función del volumen final del producto es la que sigue:

Volumen total del producto (mililitros)	Volumen del inóculo
$V \geq 10$	1% del volumen total
$1 \leq V < 10$	100 microlitros
$V < 1$	No aplicable

En caso de que requieran dilución antes de la congelación, debe aumentarse el volumen del inóculo según el factor de dilución. Para otros productos celulares, las cantidades mínimas adecuadas se definen en términos de volumen o de número de dosis con un volumen mínimo aconsejable de 1 ml por frasco. Volúmenes inferiores deben justificarse y validarse previamente.

Adicionalmente se entregará una muestra de producto final en recipiente estéril para realizar tinciones de bacterias y hongos directas. Este procedimiento permite una liberación temprana del lote en los productos de vida media corta. El responsable del procedimiento debe asegurarse de la correcta identificación de los frascos y recipientes con muestras.

#### 4.3. FRECUENCIA DEL MUESTREO

Todos los lotes de producto fabricado en las salas de producción deben someterse a los controles de calidad, pudiendo llevarse a cabo en el mismo centro o en laboratorios de referencia. En cualquier caso, se seguirá el plan de calidad establecido en el centro de producción.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

#### 4.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras serán transportadas al laboratorio de Microbiología a la mayor brevedad posible. Si se va a retrasar la inoculación de la muestra en los medios de cultivo, ésta debe conservarse a  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , para evitar que los microorganismos que pudiera haber en la muestra sean fagocitados por células presentes en algunos productos celulares, por ejemplo, neutrófilos. En caso de que los frascos de hemocultivo, una vez inoculados, no puedan introducirse en el incubador, deben mantenerse a una temperatura de entre  $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$ , por un tiempo no superior a 12 horas. Si se supera este límite de tiempo, se deben realizar subcultivos de salida.

#### 4.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se considerarán incidencias relacionadas con la recepción de la muestra: el retraso en el transporte, la conservación defectuosa (temperatura inadecuada).

Se considerarán motivos de rechazo los siguientes:

- Muestras sin identificar y en las que no haya sido posible resolver la incidencia
- Muestras derramadas

### 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

#### 5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Medio líquido con tioglicolato
- Medio líquido con hidrolizado de caseína y soja (TSB)
- Medios sólidos generales (por ejemplo, agar sangre, agar chocolate) y diferenciales para realizar subcultivos, si fuera necesario aislar posibles microorganismos causantes de contaminación
- Frascos de hemocultivo aerobio, anaerobio y pediátrico

#### 5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Cepas patrón necesarias para el ensayo de promoción del crecimiento y el ensayo de idoneidad del método: ver tablas en los puntos 7. 2 y 7. 3.

Existen comercializadas cepas de referencia calibradas que consisten en bolas hidrosolubles que contienen el número preciso de microorganismos necesarios para llevar a cabo los ensayos.

### 6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Pinzas estériles
- Asas de siembra estériles
- Estufa de aerobiosis a  $20^{\circ}\text{-}25^{\circ}\text{C}$
- Estufa de aerobiosis a  $30^{\circ}\text{C-}35^{\circ}\text{C}$
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Incubador de lectura automatizada de hemocultivos: Bactec (BectonDickinson), BacT/Alert (bioMérieux)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

## 7. PROCESAMIENTO

Los medios de cultivo utilizados deben satisfacer los siguientes ensayos, efectuados antes del análisis del producto a examinar o en paralelo.

### 7.1. ENSAYO DE ESTERILIDAD DEL MEDIO

La esterilidad de cada lote del medio se lleva a cabo incubando a 35-37°C un frasco aerobio y otro anaerobio durante al menos 7 días en el incubador automatizado. En el caso de usar otros medios líquidos hay que incubar muestras de los mismos durante 14 días. No se debe observar proliferación de microorganismos.

Deberá efectuarse con ambos medios (caldo tioglicolato a 30-35°C y caldo de hidrolizado de caseína y soja a 20-25°C).

### 7.2. ENSAYO DE FERTILIDAD (O PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO) DEL MEDIO PARA BACTERIAS AEROBIAS, ANAEROBIAS Y HONGOS

Utilizar un mínimo de 2 medios de cultivo enriquecidos adecuados para la detección de bacterias aerobias, anaerobias y hongos. Son adecuados los medios para hemocultivo. Sembrar entre 10-100 microorganismos de cada una de las cepas de referencia (ver tabla 1) e incubar a 35-37°C durante 7 días en incubador automatizado (medios de hemocultivo) o durante 14 días (caldo tioglicolato a 30-35°C y caldo de hidrolizado de caseína y soja a 20-25°C), si se realiza inspección visual de los medios. El ensayo será satisfactorio si se obtiene crecimiento en todos los frascos o medios sembrados.

Tabla 1.- Cepas patrón utilizadas para realizar el ensayo de promoción del crecimiento

<b>Medio aerobio</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
<b>Medio anaerobio</b>	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 25285, CIP 77.16, NCTC 9343

### 7.3. ENSAYO DE IDONEIDAD DEL MÉTODO

Se comprueba que el método detecta el crecimiento de microorganismos en presencia de producto a examinar. Se valida la especificidad (ausencia de resultados falsos positivos), sensibilidad (límite de detección) y reproducibilidad. El límite de detección del ensayo se determina utilizando como inóculo el producto contaminado en diferentes grados, con los microorganismos mostrados en la tabla 2, elegidos por su probabilidad de contaminación y sus requisitos de crecimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

Tabla 2.- Cepas patrón para realizar el ensayo de idoneidad del método

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437
<i>Propionibacterium</i> ( <i>Cutibacterium</i> ) <i>acnes</i>	ATCC 11827
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615, CIP 1042.26, NCIMB 13285
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610, CIP 80.27, NCTC 12982

En función del origen de las células y de otros factores, como unos resultados de cultivos anteriores positivos, puede ser necesario modificar el listado de microorganismos patrón a ensayar.

El ensayo de idoneidad del método se efectúa:

- Quando el ensayo de esterilidad debe realizarse en un nuevo producto;
- Cada vez que se realiza una modificación de las condiciones experimentales del ensayo.

#### 7.4. ENSAYO DE ESTERILIDAD DEL PRODUCTO A EXAMINAR (CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS CELULARES)

Se aconseja el uso de frascos de hemocultivo para sistemas de monitorización continua, frente a medios líquidos de inspección visual, ya que los primeros pueden disminuir el tiempo de detección  $a \leq 7$  días en lugar de los 14 necesarios utilizando medios sin lectura automatizada (USP 1071 [https://doi.usp.org/USP-NF/USPNF\\_M12457\\_02\\_01.html](https://doi.usp.org/USP-NF/USPNF_M12457_02_01.html)). Los frascos contienen caldo digerido de soja y caseína enriquecido. Los protocolos de incubación son los siguientes, en función del medio utilizado:

Frascos de hemocultivo: 35-37°C durante, al menos, 7 días;

Caldo tioglicolato: 30-35°C durante 14 días;

Caldo caseína y soja: 20-25°C durante 14 días.

Si se realiza el test utilizando medios de cultivo sin lectura automatizada, efectuar la inspección visual de turbidez del medio diariamente. Para el subcultivo de frascos marcados como positivos o medios líquidos donde se observe turbidez, se utilizarán medios sólidos adecuados, enriquecidos y/o diferenciales (agar sangre, agar chocolate, MacConkey). Las muestras para tinciones de hongos y bacterias (liberación urgente de productos de terapia celular) se procesarán según el protocolo general de las tinciones elegidas. Se recomienda la tinción de Gram para el despistaje de bacterias y la tinción de calcoflúor para hongos.

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las tinciones se informarán cuando estén disponibles indicando si se observan formas



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de esterilidad de los preparados de terapia celular y derivados hematopoyéticos	PNT-CE-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

compatibles con la presencia microorganismos. En medios líquidos, si no se observa turbidez al finalizar el periodo de incubación, se informará como cultivo negativo. En el caso de la utilización de frascos de hemocultivo, debe realizarse una inspección visual de los mismos al final de la incubación para descartar la presencia de hongos filamentosos no detectados por el instrumento. Si se obtiene crecimiento se informará como cultivo positivo, realizando identificación a nivel de especie y antibiograma mediante la metodología de rutina del laboratorio de Microbiología. La presencia de enterobacterias y en general bacterias y hongos considerados virulentos da lugar a la no conformidad del producto y la suspensión del tratamiento. En el caso de los microorganismos aislados frecuentemente de la piel, como estafilococos coagulasa negativa o estreptococos del grupo *viridans*, puede requerirse el cultivo de una segunda muestra para confirmar el resultado.

## 9. RESPONSABILIDADES

- Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.
- El personal técnico es responsable de la realización de los procedimientos microbiológicos de identificación, así como del registro de resultados.
- El personal facultativo es responsable de la supervisión de la técnica, supervisión de la lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes.
- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante.
- Es responsabilidad del laboratorio de Microbiología poner a disposición de las áreas clínicas, donde habitualmente se recogen las muestras, los medios de cultivo y otros materiales para su inoculación y transporte, así como informar del modo de conservación de los medios de cultivo.

## 10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un resultado satisfactorio en el ensayo de esterilidad de un producto celular solo significa que no se han encontrado microorganismos en la muestra examinada en las condiciones del ensayo.

## 11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los centros están obligados a mantener un sistema de trazabilidad de todos los productos, incluidas las materias primas que se han utilizado y cualquier material que haya estado en contacto con los productos celulares. El centro hospitalario debe conservar los datos durante un periodo de tiempo de 30 años tras la fecha de caducidad del producto. La farmacovigilancia también será responsabilidad del hospital que tiene la autorización de uso y deberán hacer informes periódicos de seguridad a la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios).

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Ver documentos de consulta

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

## PNT-CE-03

### Control de *Mycoplasma* spp. en los preparados de terapia celular

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....  
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir el procedimiento para llevar a cabo el control de la contaminación con *Mycoplasma* spp. de los preparados para terapia celular que se producen en salas blancas hospitalarias.

## 2. FUNDAMENTO

La contaminación por micoplasmas de los cultivos celulares es un problema relativamente frecuente y subestimado debido a la dificultad de su detección. Las propiedades de las células se ven afectadas por estos microorganismos, por lo que resulta imprescindible llevar a cabo procedimientos para detectar su presencia en los cultivos antes de liberar los productos para su uso en terapia celular.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sección 2.6.7. MICOPLASMAS de la Real Farmacopea Española <https://extranet.boe.es/farmacopea/>
- Guideline on human cell-based medicinal products EMEA/CHNP/410869/2006. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf)

## 4. MUESTRAS

### 4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición, o la petición electrónica que acompaña a cada muestra, debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente:

- Datos demográficos y de la muestra (fecha de obtención de la muestra, tipo de producto, fecha de preparación, número de lote y similares), servicio de procedencia y datos del facultativo que realiza la petición.
- Determinaciones microbiológicas solicitadas.

### 4.2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben ser representativas de los derivados terapéuticos fabricados (células madre u otros). Todos los productos de terapia celular en fase final, previamente a su liberación, deben ser sometidos al ensayo de detección de micoplasmas. El personal de producción de las salas será el responsable de tomar las muestras, introducirlas en un recipiente estéril y entregarlas al responsable de control de calidad para la realización del ensayo.

### 4.3. FRECUENCIA DEL MUESTREO

Todos los lotes de productos celulares fabricados en las salas de producción deben someterse a los controles de detección de *Mycoplasma* spp. antes de su liberación.

### 4.4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras serán transportadas al laboratorio de Microbiología en recipiente estéril a temperatura ambiente a la mayor brevedad posible. Es recomendable avisar al responsable del laboratorio de Microbiología de la hora prevista de entrega de las muestras para evitar la demora del procedimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

#### 4.5. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Las muestras serán transportadas al laboratorio de Microbiología en recipiente estéril a temperatura ambiente a la mayor brevedad posible. Es recomendable avisar al responsable del laboratorio de Microbiología de la hora prevista de entrega de las muestras para evitar la demora del procedimiento.

### 5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

#### 5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Medios para cultivo de micoplasmas: medio Hyflick, medio Friis, medio Frey.

#### 5.2. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Cepas patrón necesarias para el ensayo de promoción del crecimiento y el ensayo de idoneidad del método: ver tabla en el punto 7.

### 6. APARATOS Y MATERIALES

- Termocicladores
- Cubetas de electroforesis

### 7. PROCESAMIENTO

El ensayo para la detección de micoplasmas puede realizarse por diferentes técnicas basadas en el cultivo o en la amplificación de ácidos nucleicos.

#### 1) Método mediante cultivo

Como requisito previo al ensayo para detectar micoplasmas en el producto a analizar, se debe demostrar que cada lote del conjunto de medios elegidos presenta propiedades nutritivas satisfactorias, al menos para los microorganismos indicados en la tabla 1. Se realizará además un ensayo de sustancias inhibitorias una sola vez por cada tipo de producto y sólo se repetirá si se produce algún cambio en la metodología de producción que pueda afectar a la detección de micoplasmas. Este se lleva a cabo mediante la realización de un ensayo de propiedades nutritivas en presencia y ausencia del producto a examinar.

Tabla 1.- Cepas patrón utilizadas en el método mediante cultivo para detección de *Mycoplasma* spp.

<i>A. laidlawii</i>	NCTC 10116	CIP 75.27	ATCC 23206
<i>M. gallisepticum</i>	NCTC 10115	CIP 104967	ATCC 19610
<i>M. fermentans</i>	NCTC 10117	CIP 105680	ATCC 19989
<i>M. hyorhinis</i>	NCTC 10130	CIP 104968	ATCC 17981
<i>M. orale</i>	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714
<i>M. pneumoniae</i>	NCTC 10119	CIP 103766	ATCC 15531
<i>M. synoviae</i>	NCTC 10124	CIP 104970	ATCC 25204

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

### A) Propiedades nutritivas

Se realizará el ensayo para determinar las propiedades nutritivas en cada nuevo lote de medio. Para ello, hay que sembrar en los medios elegidos las cepas patrón, utilizando como máximo 100 UFC por placa de 60 mm de diámetro que contenga 9 mL de medio sólido y por envase de 100 mL de medio líquido. Para cada especie de microorganismos se utilizará una placa y envase distinto. Incubar los medios y realizar subcultivos desde 0,2 mL de medio líquido hasta el medio sólido a intervalos específicos según se describe en el siguiente apartado B) “ensayo para la detección de micoplasmas en el producto a examinar”. El medio sólido satisface el ensayo si se observa crecimiento adecuado para cada microorganismo de ensayo (el crecimiento obtenido no difiere en un factor superior a 5 del valor calculado para el inóculo). El medio líquido satisface el ensayo si se observa crecimiento sobre placas de agar-agar subcultivadas en el caldo en al menos 1 subcultivo de cada microorganismo de ensayo.

### B) Ensayo para la detección de micoplasmas en el producto a examinar

Los medios de cultivo recomendados en la Farmacopea Europea son: medio Hayflick (recomendado para la detección de micoplasmas en general), medio Frey (recomendado para la detección de *M. synoviae*) y medio Friis (micoplasmas no aviares). Se sembrarán las muestras a examinar en medios de cultivo líquidos y sólidos. Sembrar 10 mL del producto a examinar en 100 mL del medio de cultivo líquido. Si el pH del medio cambia significativamente, se restablece por adición de una solución de hidróxido de sodio o de ácido clorhídrico. Sembrar 0,2 mL del producto a examinar en las placas de medio sólido. Como controles negativos se utilizarán placas de medio sólido y un volumen de 100 mL del medio líquido y sin inocular. Incubar los medios líquidos en envases herméticos a 35-38°C y los medios sólidos en microaerofilia a 35-38°C. Incubar los medios líquidos durante 21 días. Entre los días 2-4 después de la siembra, realizar un subcultivo de cada medio líquido sembrando 0,2 mL en al menos 1 placa de cada medio sólido con el fin de tener más de un pase por si se produjera contaminación por otros microorganismos. Repetir el procedimiento entre los días 6° y 8°, entre los días 13° y 15° y, finalmente, entre los días 19° y 21° del ensayo. Todos los medios sólidos se incuban durante 14 días, excepto los del último subcultivo (días 19-21), que se incubarán 7 días. Incluir en el ensayo controles positivos sembrando como máximo 100 UFC de al menos 1 microorganismo de ensayo en medio sólido o medio líquido. Se recomienda usar los microorganismos de ensayo en rotaciones regulares.

## 2) Método mediante cultivo de células indicadoras

Este método requiere realizar cultivos celulares de micoplasmas, por lo que queda restringido a laboratorios especializados. Brevemente, consiste en teñir los cultivos celulares con un colorante fluorescente que se une al ADN. Los micoplasmas se detectan por el aspecto característico en partículas o en filamentos, de la fluorescencia observada en la superficie de las células. Se utilizan células Vero u otras con capacidad similar para el cultivo de micoplasmas. Los procedimientos específicos están disponibles para su consulta en la sección 2.6.7 de la Real Farmacopea Española.

## 3) Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos pueden aplicarse en lugar del método por cultivo y el método por cultivo de células indicadoras y cuando así lo indique la monografía. La PCR es un método sensible y específico para detectar la presencia de ADN de micoplasmas (no necesariamente micoplasmas viables) en el sobrenadante de los cultivos celulares. Es necesario, como en otros casos, llevar a

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición Nº 01	Página 5 de 6

cabo la validación del método antes de ponerlo en marcha o bien adquirir un *kit* comercial validado según Farmacopea Europea (los detalles de la metodología pueden consultarse en la sección 2.6.7 MICOPLASMAS de la Real Farmacopea Española). Cuando se utilice un *kit* comercial, ciertas partes de la validación pueden haberse llevado a cabo por la casa comercial, pero debe tenerse en cuenta que es posible que la información a este respecto no sea accesible en su totalidad. En la actualidad, es frecuente el uso de *kits* comerciales que detectan la región codificante del ARNr 16S del genoma de los micoplasmas. Existen en el mercado variantes de PCR a tiempo real o PCR convencional, validadas según farmacopea para muestras de cultivos celulares, siempre que se realice previamente una extracción del ADN. Como ejemplo de *kits* validados pueden consultarse los detalles en la página web del fabricante (<https://minerva-biolabs.com/en/mycoplasma-detection-kits>).

## 8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En el método mediante cultivo, observar los medios líquidos cada 2-3 días y si se advierte un cambio de color realizar un subcultivo a medio sólido. El ensayo es válido si se puede leer al menos 1 placa por medio y por día de siembra. Examinar al microscopio los medios sólidos una vez concluido el periodo de incubación. El producto satisface el ensayo si no se observa crecimiento de colonias compatibles con micoplasmas.

Si un medio líquido presenta contaminación bacteriana o fúngica, el ensayo no es válido. Tampoco es válido si uno o más de los controles positivos no presentan crecimiento de micoplasmas en al menos una placa de subcultivo. El ensayo no es válido si uno o más de los controles negativos presentan crecimiento de micoplasmas. Si se observan colonias sospechosas, se debe realizar la identificación por una metodología previamente validada.

## 9. RESPONSABILIDADES

- Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.
- El personal técnico es responsable de la realización de los procedimientos microbiológicos de identificación, así como del registro de resultados.
- El personal facultativo es responsable de la supervisión de la técnica, supervisión de la lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes.
- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante.
- Es responsabilidad del laboratorio de Microbiología poner a disposición de las áreas clínicas, donde habitualmente se recogen las muestras, los medios de cultivo y otros materiales para su inoculación y transporte, así como informar del modo de conservación de los medios de cultivo.

## 10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un resultado satisfactorio en el ensayo de esterilidad de un producto farmacéutico solo significa que no se han encontrado microorganismos en la muestra examinada en las condiciones del ensayo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Control de <i>Mycoplasma</i> spp. en los preparados de terapia celular	PNT-CE-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

## 11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los centros están obligados a mantener un sistema de trazabilidad de todos los productos, incluidas las materias primas que se han utilizado y cualquier material que haya estado en contacto con los productos celulares. El centro hospitalario debe conservar los datos durante un periodo de tiempo de 30 años tras la fecha de caducidad del producto. La farmacovigilancia también será responsabilidad del hospital que tiene la autorización de uso y deberán hacer informes periódicos de seguridad a la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios).

Todo el personal que participe en alguna fase del proceso, debe quedar debidamente identificado y registrado, respetando en todo caso la ley de protección de datos mediante el sistema de codificación que se acuerde (firmas, iniciales).

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Ver documentos de consulta.