

Sievers* Soleil Rapid Microbial Method Verification Testing for USP <1223> *White Paper*

Introducción:

El analizador rápido de carga biológica o bioburden de Sievers Soleil es un innovador instrumento de método microbiano rápido (RMM) en línea diseñado para monitorizar la carga biológica a niveles ultrapuros utilizando tinciones basadas en fluorescencia con resultados en menos de 45 minutos. Además de ser rápido, fácil de usar, portátil y flexible, Soleil proporciona pruebas casi en tiempo real que son equivalentes a los métodos compendiales de recuento en placas, como lo demuestran los datos presentados en este informe técnico. Soleil ofrece mejoras significativas con respecto a los métodos existentes en placas de agar al mejorar las capacidades del usuario y la facilidad de uso sin sacrificar las características esenciales del recuento en placas y la tecnología de filtración por membrana. Con el analizador rápido de carga biológica de Sievers Soleil, los fabricantes pueden tomar decisiones prácticas rápidamente. Permite a los usuarios monitorizar rápida y fácilmente los niveles de carga biológica durante todo el proceso de fabricación, desde las materias primas hasta las muestras en proceso y el producto final, mitigando riesgos y mejorando las operaciones. Con la publicación del Anexo 1 en 2023, más fabricantes están adoptando métodos alternativos rápidos como medio de control de la contaminación.

Antecedentes:

Este documento técnico describe las pruebas de verificación de microorganismos de Sievers Soleil que se alinean con los parámetros mencionados en la Farmacopea de los Estados Unidos <1223> "VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS", a la vez que muestra la comparación con los métodos tradicionales de placas de agar. Los resultados se evalúan según los criterios descritos en la USP <61> "EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: PRUEBAS DE ENUMERACIÓN MICROBIOLÓGICA", USP <62> "EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO ESTÉRILES: PRUEBAS PARA MICROORGANISMOS ESPECIFICADOS", Farmacopea Europea 2.6.12 "Recuento total de aeróbicos viables en productos no estériles", EP 2.6.13 "Organismos especificados en productos no estériles" y Farmacopea Japonesa 4.05 "Examen Microbiológico de Productos No Estériles".

Se evaluaron los siguientes criterios de validación descritos en USP <1223> para Sievers Soleil: rango, linealidad, exactitud, reproducibilidad, robustez, precisión, límite inferior de cuantificación (LLOQ), límite inferior de detección (LLOD), límite superior de cuantificación (ULOQ) y Robustez. Además, este documento técnico demuestra la correlación de los recuentos totales de células viables (TVC, como informa el software Soleil) de Soleil con las unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar. Como tal, los datos aquí se expresan en UFC, ya que son comparables y equivalentes al TVC utilizando Soleil.

Se probaron un total de 11 microorganismos, así como una combinación de organismos:

- *A. brasiliensis*
- *B. cepacia*
- *B. diminuta*
- *B. subtilis*
- *C. albicans*

- *Escherichia coli*
- *P. aeruginosa*
- *R. pickettii*
- *S. aureus*
- *S. entérica*
- *S. maltophilia*
- Mezcla: *B. diminuta*, *R. pickettii*, *S. maltophilia* y *B. cepacia*

Todas las muestras se procesaron a concentraciones objetivo en volúmenes de muestra de 100 ml. Las concentraciones objetivo probadas incluyeron:

- 0,05 UFC/mL (LLOD)
- 0,1 UFC/mL (LLOQ)
- 1 UFC/mL
- 10 UFC/mL
- 100 UFC/mL (ULOQ)

Las concentraciones probadas en este estudio se eligieron específicamente según los estándares de la industria. Se seleccionó 0,05 UFC/mL porque es un límite inferior común utilizado en la industria farmacéutica. Para agua para inyectables (WFI), el límite de liberación es 0,1 UFC/ml. Las pruebas de 0,1 UFC/ml, 1 UFC/ml, 10 UFC/ml y 100 UFC/ml proporcionaron un conjunto de concentraciones de 3 log y 4 log para determinar tanto la linealidad como el límite superior de cuantificación. Para los sistemas de agua purificada, la FDA ha mencionado que cualquier límite de acción superior a 100 UFC/mL no es aceptable.

Estas pruebas también incluyeron la evaluación de controles negativos como parte de los procedimientos diarios durante las pruebas de rutina para microorganismos.

Métodos:

Control negativo

Como parte de los procedimientos de puesta en marcha diarios dentro del software Soleil, se realizaron una calibración de flujo, una prueba de estándares de idoneidad del sistema y un control negativo. A lo largo de las pruebas, seis analistas ejecutaron un total de 85 controles negativos utilizando agua para cultivo celular (WFCC) durante varias semanas, utilizando 10 instrumentos diferentes en dos ubicaciones diferentes.

Estándares de Idoneidad del Sistema (*System Suitability Standards*)

Los estándares de idoneidad del sistema son un conjunto de microesferas fluorescentes con perfiles espectrales conocidos que imitan los de microorganismos viables en dos concentraciones conocidas por mililitro. Soleil incorpora un sistema Pasa/No Pasa en el software para confirmar la precisión de los recuentos, mostrar que la calibración del flujo se ha realizado correctamente y demostrar que los analíticos están contando con precisión. Los estándares de idoneidad del sistema se ejecutaron durante la puesta en marcha del instrumento y a lo largo de todo el periodo de pruebas. El Sistema de Idoneidad (*System Suitability Standards*) 1 contenía 10 microesferas/100mL y la Idoneidad del Sistema 2 contenía 20 microesferas/100mL. Los criterios de aceptación fueron los siguientes: El estándar de idoneidad del sistema 1 era ± 5 microesferas/mL y el estándar de idoneidad del sistema 2 era ± 10 microesferas/mL.

Filtración de membrana tradicional

Durante todo el período de prueba, las muestras se probaron mediante métodos tradicionales y en el Soleil. Los organismos se añadieron a 250 ml de WFCC, se agitaron suavemente y a continuación, se licuaron para la filtración por membrana y para las pruebas en el Soleil.

Límite inferior de detección (LLOD)

LLOD tiene como objetivo determinar si la plataforma Soleil es capaz o no de distinguir entre un blanco (p. ej., muestra negativa) y un nivel bajo de contaminación, específicamente 0,05 UFC/mL. Para calcular el LLOD, se analizaron 10 réplicas de cada especie de microorganismo a 0,05 UFC/ml y se compararon con 85 muestras de control negativo durante el período de ensayo. Esta comparación se realizó mediante un análisis de variación que dio como resultado un valor p de 0,001, lo que demuestra que los datos son significativos y que el Soleil puede detectar de forma fiable niveles bajos de carga biológica por encima del nivel del control negativo.

Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

El factor LLOQ se realizó para confirmar que la plataforma Soleil puede cuantificar adecuadamente los microorganismos hasta una concentración específica. Se analizaron diez réplicas de cada microorganismo a una concentración objetivo de 0,1 UFC/ml. El criterio de aceptación para el LLOQ fue recuperar la concentración promedio en comparación con los recuentos en placa >50 % y el objetivo de ser <200 %. El criterio de aceptación para la concentración promedio se determinó porque los resultados de Soleil a veces pueden ser superiores a los de las placas de agar debido a la salud de las distintas células. Algunas células pueden estar más sanas o más débiles cuando se colocan en placas, lo que afecta a su capacidad de crecimiento. El Soleil utiliza colorantes específicos que se dirigen a los organismos, independientemente de su estado de salud.

Límite superior de cuantificación (ULOQ)

Para determinar el ULOQ, se probó una concentración objetivo de 100 UFC/mL para cada microorganismo. Se probaron seis réplicas para cada organismo en comparación con las placas de agar. El criterio de aceptación fue tener un porcentaje (%) de recuperación promedio de >50 % en comparación con los métodos tradicionales en placa de agar con un objetivo de <200 %.

Linealidad

Para esta prueba, la linealidad se denomina coeficiente de correlación sobre un mínimo de tres registros de contaminación. La linealidad debe ser superior a 0,95 según USP <1223>. Se probaron un total de cinco concentraciones en todos los organismos. Además, también se evaluó la linealidad de las placas de agar para los mismos microorganismos.

Exactitud

La precisión se define como la proximidad de los resultados obtenidos por el método de ensayo alternativo (por ejemplo, Soleil) al valor obtenido por el método compendial. el valor obtenido por el método compendial. Para verificar que el instrumento Soleil era capaz de medir la cantidad de microorganismos con exactitud, se realizó el método tradicional de filtración por membrana junto con el Soleil. Cada muestra se alicuotó uniformemente entre el Soleil y el método de la placa para garantizar que ambos métodos analizaban la misma muestra y se compararon los promedios de cada concentración objetivo para evaluar la precisión. Las concentraciones analizadas fueron 0,05 UFC/mL, 0,1 UFC/mL, 1 UFC/mL, 10 UFC/mL y 100 UFC/mL.

Precisión

También conocida como repetibilidad, la precisión es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestras de la misma inoculación. La precisión se evaluó en todo el rango del ensayo (0,1 UFC/ml a 100 UFC/ml) en Soleil comparando el coeficiente de variación (CV) de diez réplicas evaluadas en cada una de las concentraciones más bajas (0,05, 0,1 y 1 UFC/ml) y seis réplicas para las concentraciones más altas (10 UFC/ml y 100 UFC/ml).

Placa de agar

Las concentraciones para este estudio se prepararon utilizando el siguiente método. Las concentraciones se dirigieron a 0,05 UFC/ml, 0,1 UFC/ml, 1 UFC/ml, 10 UFC/ml y 100 UFC/ml en volúmenes de 125 ml en botellas de PET estériles. Se realizaron diluciones seriadas para obtener la concentración deseada. Las soluciones se agregaron a WFCC tamponado para mantener la integridad celular. Se utilizaron placas de agar que contenían agar de soja triptico (TSA) o agar dextrosa sabouraud (SDA) como se indica en USP <61> y USP <62>. Cada solución se filtró a través de un colector sobre un filtro estéril. Luego se transfirió asépticamente el filtro a la placa de agar. Las placas se incubaron en una incubadora de células durante un mínimo de tres días.

Para las muestras de 100 UFC/ml, se utilizaron placas de inmersión. La solución madre de 100 UFC/ml se transfirió a placas de agar que contenían el medio apropiado. Luego se utilizó un esparcidor de células estéril para distribuir el líquido por la superficie. Las placas se incubaron durante un mínimo de tres días.

Resultados:

Control negativo

Los 85 controles negativos a lo largo de esta prueba estaban por debajo de 6 UFC/100 ml. El promedio de UFC/ml fue de 0,0068 UFC/ml, que estaba por debajo de los requisitos internos de <0,05 UFC/ml (Tabla 1 a continuación).

Estándares de Idoneidad del Sistema (*System Suitability Standards*)

Todos los estándares de idoneidad del sistema pasaron los criterios de aceptación establecidos en el software Soleil. Los criterios de aceptación son los siguientes: El estándar de idoneidad del sistema 1 es ± 5 perlas/ml y el estándar de idoneidad del sistema 2 es ± 10 microesferas/mL.

Límite inferior de detección

El recuento biótico promedio para todos los microorganismos a una concentración objetivo de 0,05 UFC/ml fue de 0,055 UFC/ml, como se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1: Promedio de los controles negativos y resultados para el límite inferior de detección

	0,05 UFC/mL		
	Promedio	Mínimo	Máximo
<i>A. brasiliensis</i>	0.063	0.030	0,09
<i>B. cepacia</i>	0.039	0.010	0.012
<i>B. diminuta</i>	0,078	0.040	0,015
<i>B. subtilis</i>	0.061	0.020	0.012
<i>C. albicans</i>	0.090	0.020	0.021
<i>E. coli</i>	0.052	0.010	0.090
<i>P. aeruginosa</i>	0.036	0.020	0.060
<i>R. pickettii</i>	0.037	0.0	0.080
<i>S. aureus</i>	0,058	0.020	0.090
<i>S. entérica</i>	0.066	0.030	0.011
<i>S. maltophilia</i>	0.041	0.010	0.090
Mezcla	0,071	0.010	0,015
Promedio de todos los microbios	0.055	0,018	0.0113
Control negativo	0.0068	0.0	0,06

Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

La concentración objetivo para la determinación del LLOQ fue 0,1 UFC/ml en todos los organismos. El porcentaje de recuperación promedio fue del 140,9 %, que fue >50 % y logró el objetivo de <200 % establecido por los criterios de aceptación. Los resultados se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados para el límite inferior de cuantificación

	0,1 UFC/mL		
	Promedio	Mínimo	Máximo
<i>A. brasiliensis</i>	70,6%	25,0%	113,0%
<i>B. cepacia</i>	97,6%	23,8%	238,1%
<i>B. diminuta</i>	180,8%	125,0%	271,0%
<i>B. subtilis</i>	172,0%	58,0%	484,0%
<i>C. albicans</i>	162,3%	77,9%	389,6%
<i>E. coli</i>	137,4%	78,9%	189,5%
<i>P. aeruginosa</i>	98,4%	62,5%	203,1%
<i>R. pickettii</i>	108,0%	50,0%	182,0%
<i>S. aureus</i>	262,5%	125,0%	625,0%
<i>S. entérica</i>	155,3%	78,0%	400,0%
<i>S. maltophilia</i>	155,4%	29,0%	400,0%
Mezcla	90,1%	24,0%	213,0%
Promedio de todos los microbios	140,9%	63,1%	309,0%

Límite superior de cuantificación

La recuperación promedio para el límite superior de 100 UFC/ml fue del 136,7 % en múltiples organismos (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados para el límite superior de cuantificación

	100 UFC/mL		
	Promedio	Mínimo	Máximo
<i>A. brasiliensis</i>	82,7%	64,0%	112,0%
<i>B. cepacia</i>	74,7%	53,2%	97,3%
<i>B. diminuta</i>	272,0%	135,0%	453,0%
<i>B. subtilis</i>	313,3%	164,0%	508,0%
<i>C. albicans</i>	95,5%	77,9%	106,3%
<i>E. coli</i>	134,0%	117,0%	143,0%
<i>P. aeruginosa</i>	106,0%	100,5%	109,8%
<i>R. pickettii</i>	45,8%	37,0%	50,0%
<i>S. aureus</i>	152,8%	136,3%	164,5%
<i>S. entérica</i>	138,2%	92,0%	218,0%
<i>S. maltophilia</i>	115,2%	91,0%	146,0%
Mezcla	109,8%	95,0%	129,0%
Promedio de todos los microbios	136,7%	96,9%	186,4%

Linealidad

Se determinaron los cálculos de regresión por mínimos cuadrados y los correspondientes valores del coeficiente de determinación (R^2) para una evaluación de 4 log y dos evaluaciones de 3 log. Estos valores figuran en la tabla 4 (la especificación USP <1223> la especificación para R^2 es $\geq 0,95$). La plataforma Soleil es capaz de ejecutar un máximo de 4 logs. Los gráficos de linealidad para Soleil y las placas de agar se presentan en el Apéndice.

Tabla 4: Resultados de linealidad de Soleil para 4 log y 3 log

	Linealidad (R^2) de Soleil		
	4 Logs	3 Logs	
	0,1 - 100 UFC/mL	0,1 - 10 UFC/mL	1 - 100 UFC/mL
<i>A. brasiliensis</i>	0.960	0.956	0.954
<i>B. cepacia</i>	0.932	0.961	0.922
<i>B. diminuta</i>	0,992	0,992	0.991
<i>B. subtilis</i>	0.984	0.980	0.981
<i>C. albicans</i>	0.990	0.926	0.989
<i>E. coli</i>	0.993	0,979	0,992
<i>P. aeruginosa</i>	0,998	0.989	0,998
<i>R. pickettii</i>	0.963	0.984	0,957
<i>S. aureus</i>	0.989	0.987	0.987
<i>S. entérica</i>	0.996	0,957	0.996
<i>S. maltophilia</i>	0.963	0.993	0,957
Mezcla	0.990	0.994	0.988
Promedio de todos los microbios	0,979	0.975	0,976

También se calculó la linealidad para todos los organismos para las placas de agar, Tabla 5 (página siguiente). La linealidad promedio para las placas de agar para 4 logs fue de 0,952 considerando 0,1-100 UFC/ml.

Tabla 5: Resultados de linealidad de placas de agar

	Linealidad (R ₂) de placas de agar		
	4 Logs	3 Logs	
	0,1 - 100 UFC/mL	0,1 - 10 UFC/mL	1 - 100 UFC/mL
<i>A. brasiliensis</i>	0.996	0.989	0,995
<i>B. cepacia</i>	1.000	1.000	1.000
<i>B. diminuta</i>	0,756	0.937	0,723
<i>B. subtilis</i>	0.812	0,788	0,788
<i>C. albicans</i>	1.000	1.000	1.000
<i>E. coli</i>	0,999	0,997	0,999
<i>P. aeruginosa</i>	1.000	1.000	1.000
<i>R. pickettii</i>	0,986	0.994	0.983
<i>S. aureus</i>	0.996	0.954	0,995
<i>S. entérica</i>	0,928	0.969	0.917
<i>S. maltophilia</i>	0.984	0.826	0.981
Mezcla	0.970	0.966	0.966
Promedio de todos los microbios	0,952	0,952	0.946

Exactitud

El criterio de aceptación de precisión para la plataforma Soleil es una recuperación promedio de >50 % y <200 % en comparación con los recuentos de placas tradicionales de filtración por membrana. La recuperación promedio en todas las pruebas de microorganismos fue del 137,7 %, como se ve en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados de precisión del Sievers Soleil

	Promedio en todas las concentraciones (%)		
	Promedio	Mínimo	Máximo
<i>A. brasiliensis</i>	76,7	46,6	111,8
<i>B. cepacia</i>	98,2	55.0	193.3
<i>B. diminuta</i>	206.6	103.8	355,6
<i>B. subtilis</i>	216.2	109,8	446.2
<i>C. albicans</i>	124,9	61,8	244,8
<i>E. coli</i>	155,4	85,9	214,7
<i>P. aeruginosa</i>	95,5	68,8	136.0
<i>R. pickettii</i>	80.1	41,8	126,6
<i>S. aureus</i>	192,4	119.0	303.7
<i>S. entérica</i>	147,2	89,6	294,8
<i>S. maltophilia</i>	134,4	54,8	386.0
Mezcla	125.0	60.0	283,4
Promedio de todos los microbios	137,7	74,7	258.1

Precisión

Se calculó el Coeficiente de Variación (CV) para cada microorganismo analizado. Los métodos tradicionales suelen tener un límite de % CV del 35 %, ya que los microorganismos pueden crecer de manera diferente en las placas de agar. A partir de los datos de la Figura 1, se determinó que el LLOQ fue 1 UFC/mL, ya que esa fue la concentración más baja que mostró el mejor rendimiento CV, siendo el promedio inferior al 25 %.

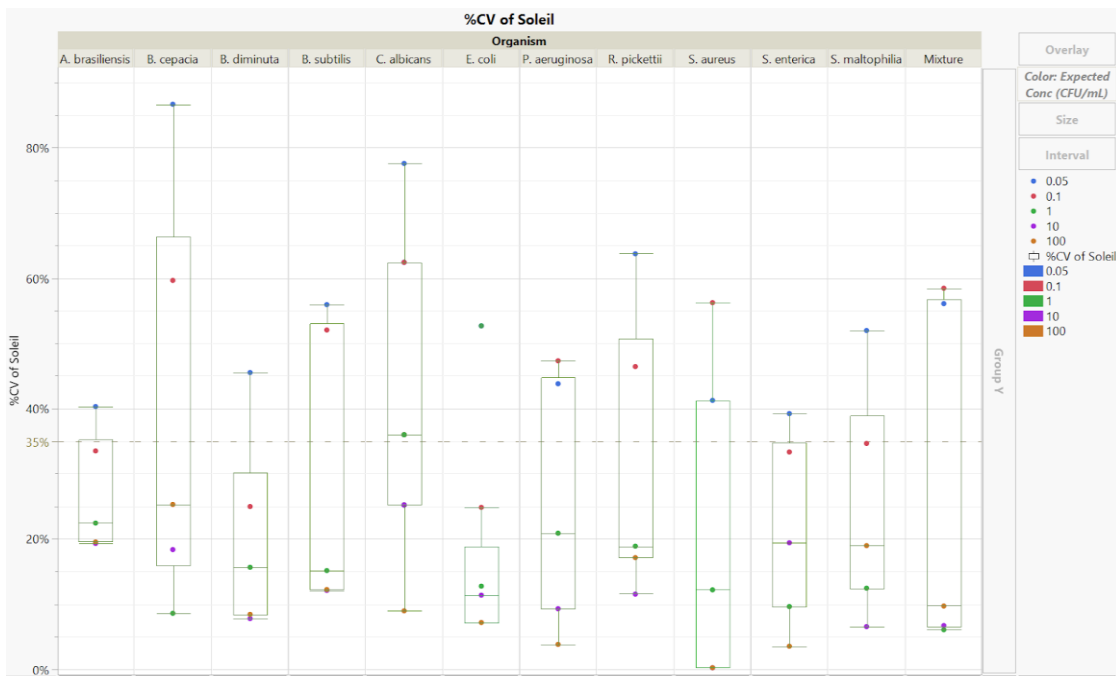


Figura 1

La Figura 2 muestra la precisión de las placas de agar en las distintas concentraciones.

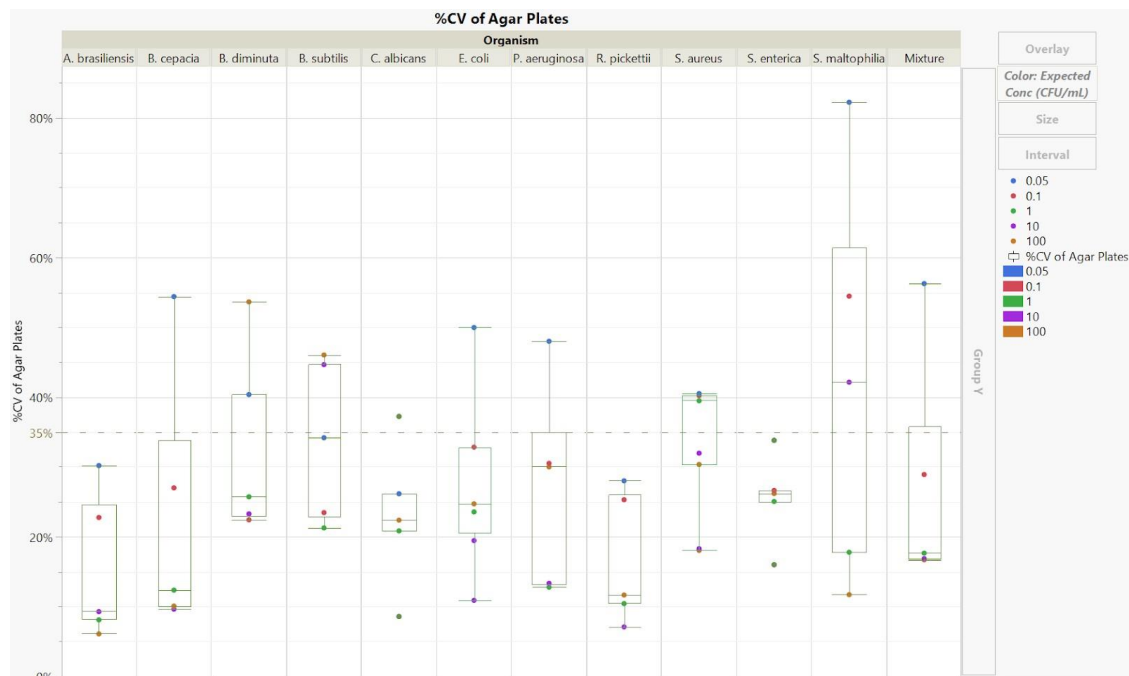


Figura 2

Conclusión

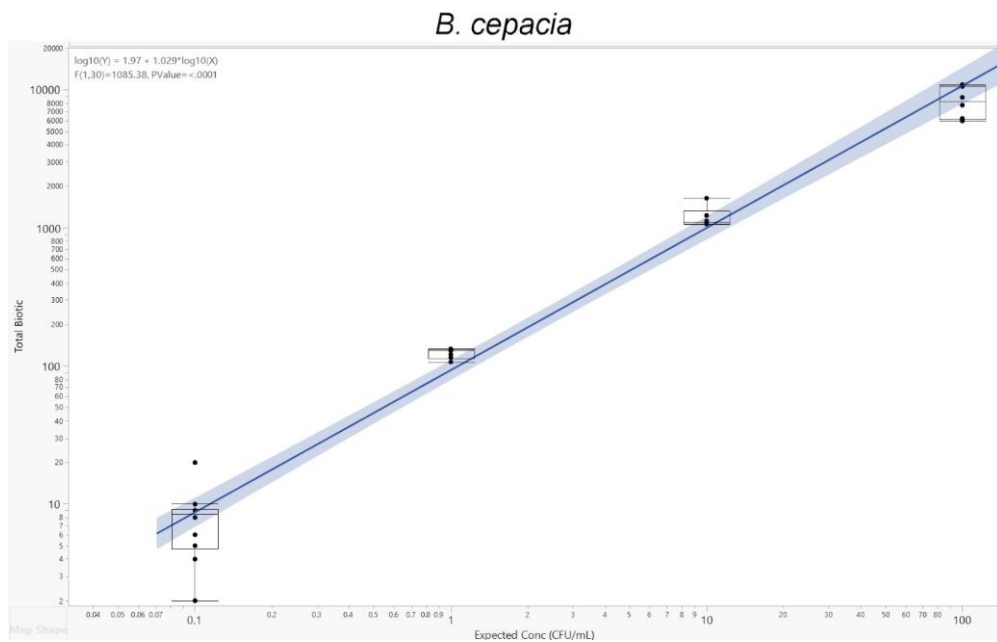
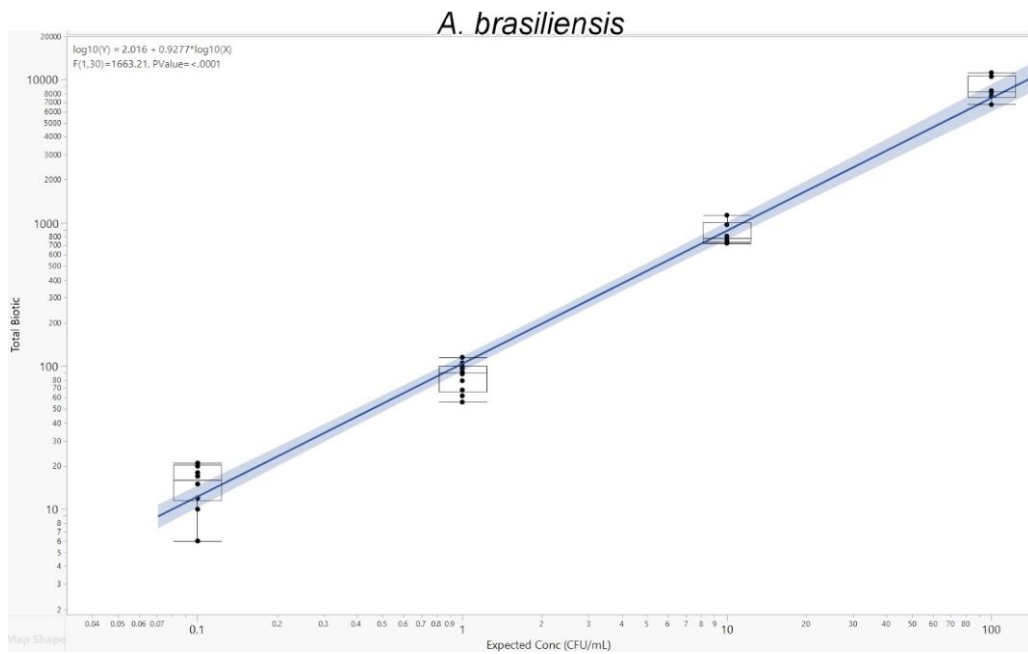
El analizador rápido de carga biológica o bioburden de Sievers Soleil ha demostrado la capacidad de detectar y cuantificar bacterias (tanto grampositivas como gramnegativas), levaduras y moho en menos de 45 minutos con exactitud, linealidad y precisión aceptables, como se describe en la USP <1223>. Con un límite de detección de 0,05 UFC/mL y un límite de cuantificación de 1,0 UFC/mL o menos, Soleil muestra idoneidad para todos los niveles de pruebas de agua de alta pureza.

Referencias

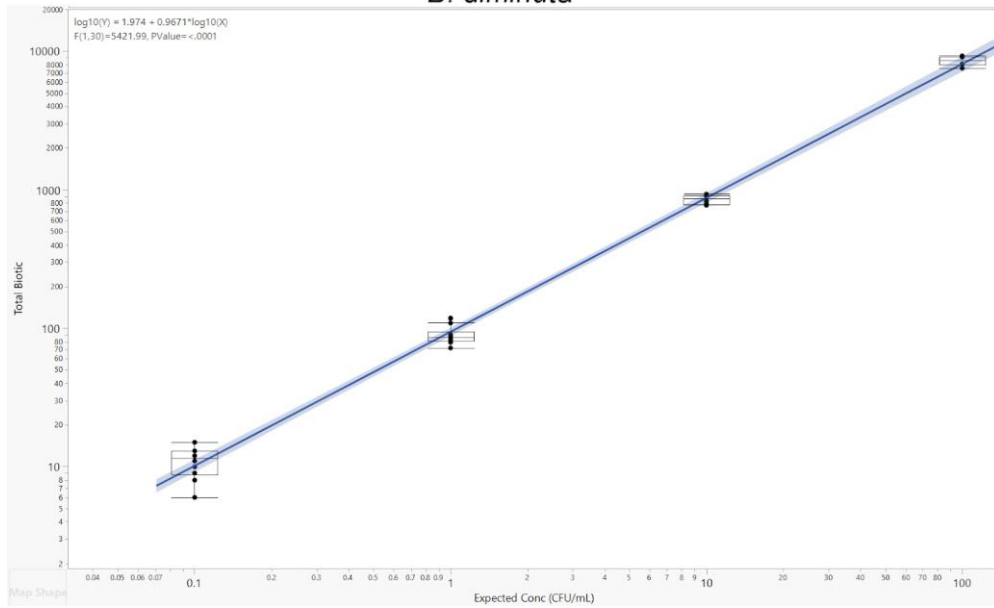
1. USP <1223> Validación de métodos microbiológicos alternativos
2. EP 2.6.12 Recuento total de aeróbicos viables de productos no estériles
3. EP 2.6.13 Productos no estériles Organismos especificados
4. JP 4.05 Examen microbiológico de productos no estériles

Apéndice

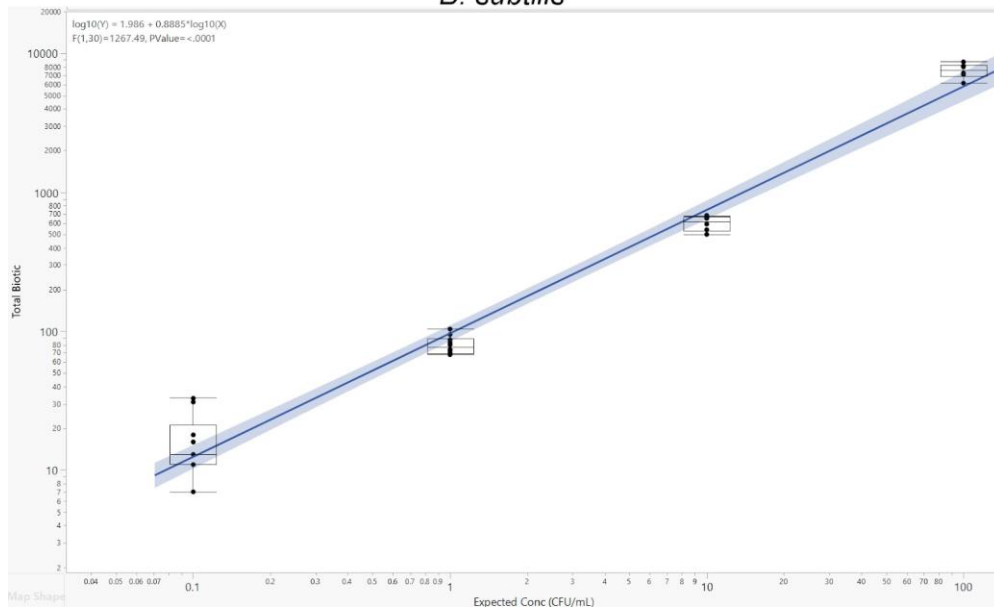
Linealidad

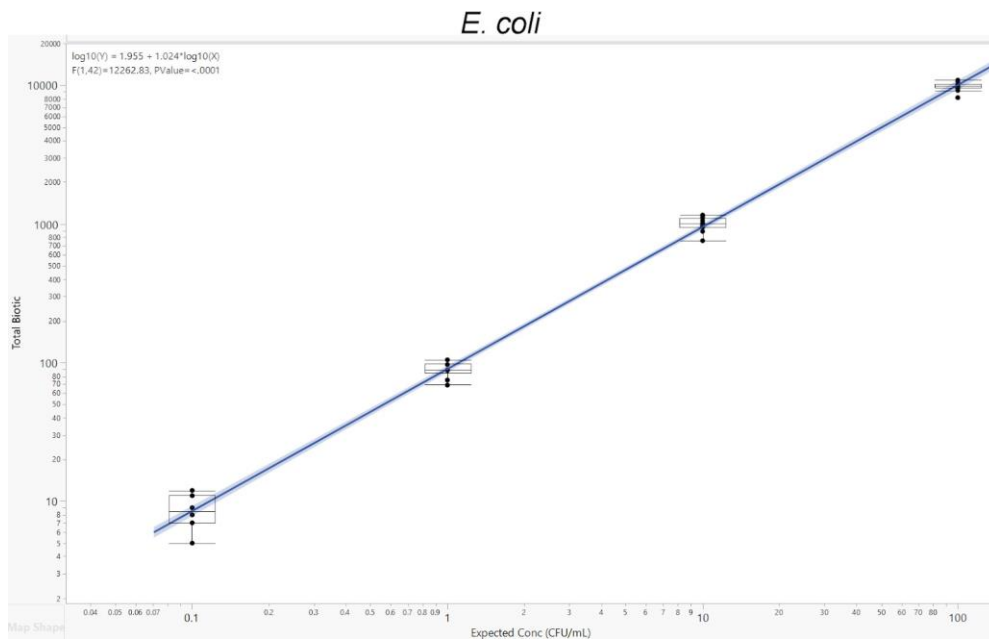
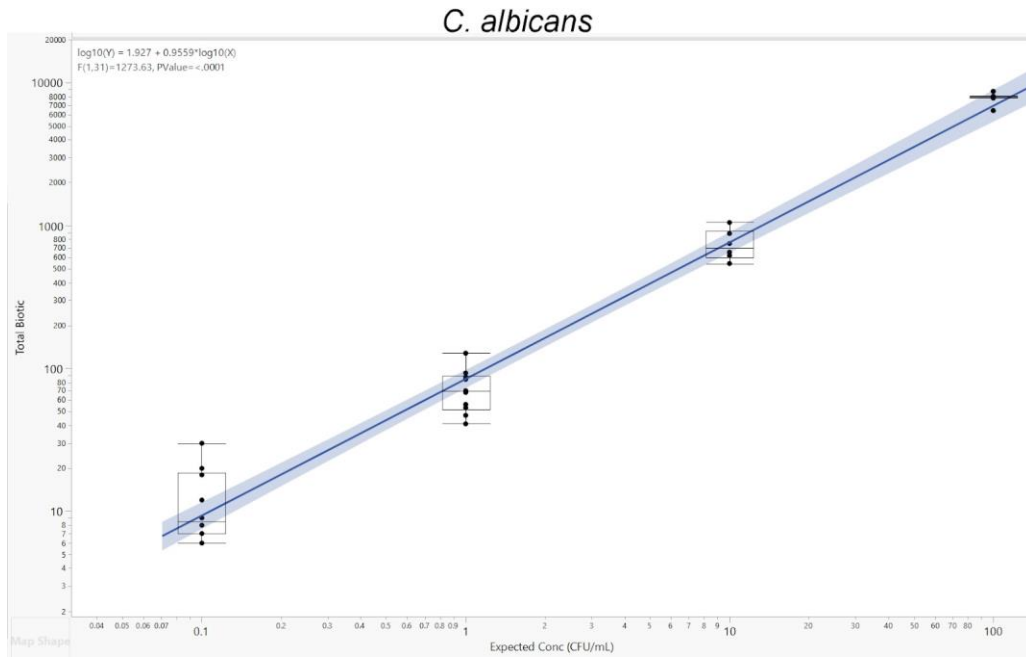


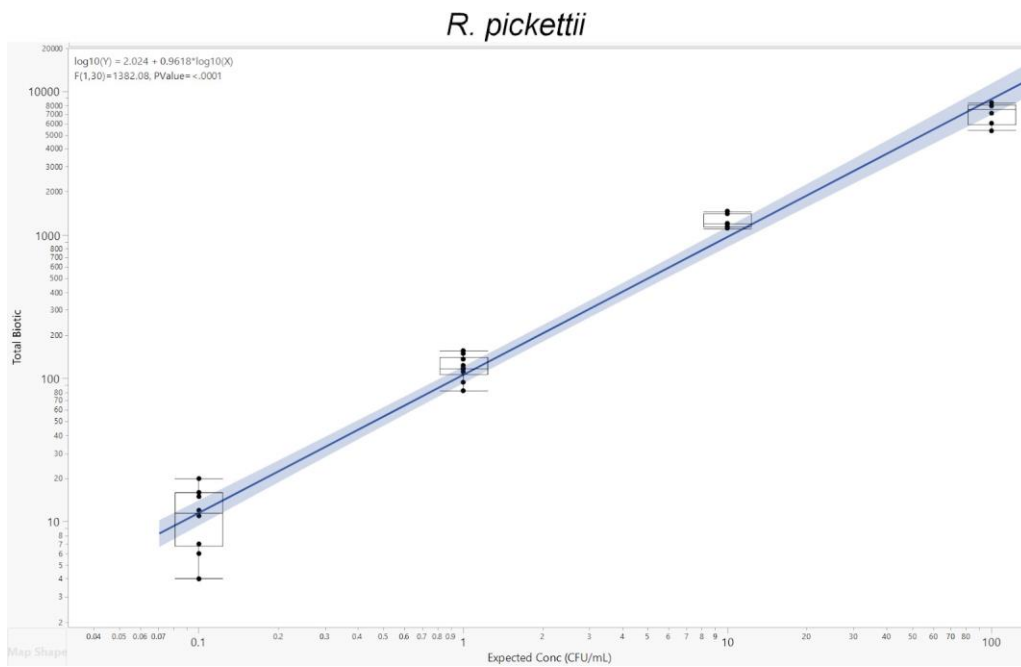
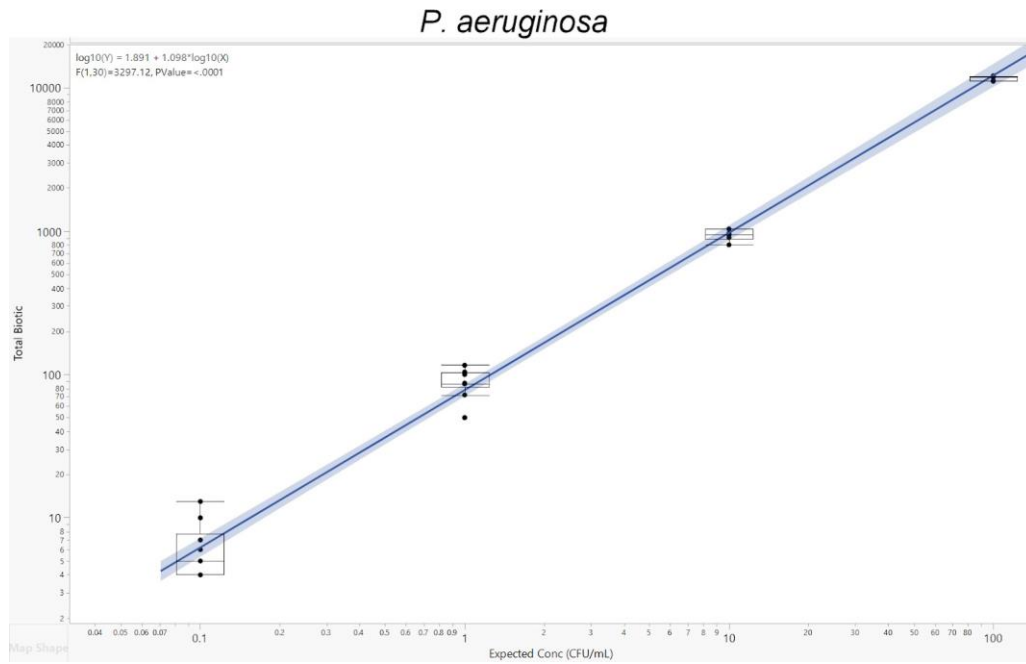
B. diminuta

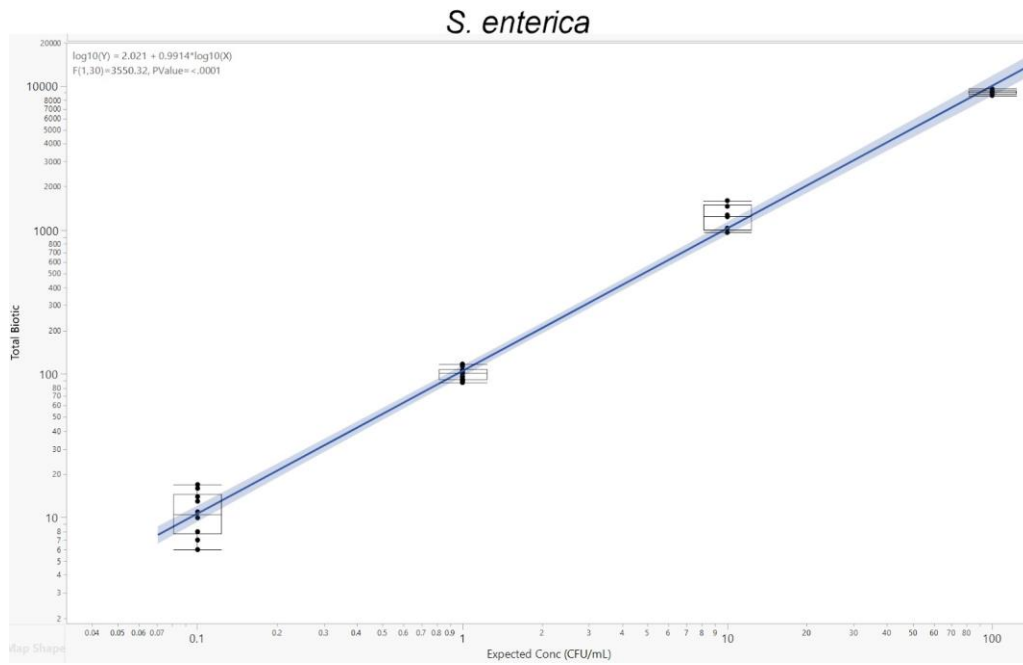
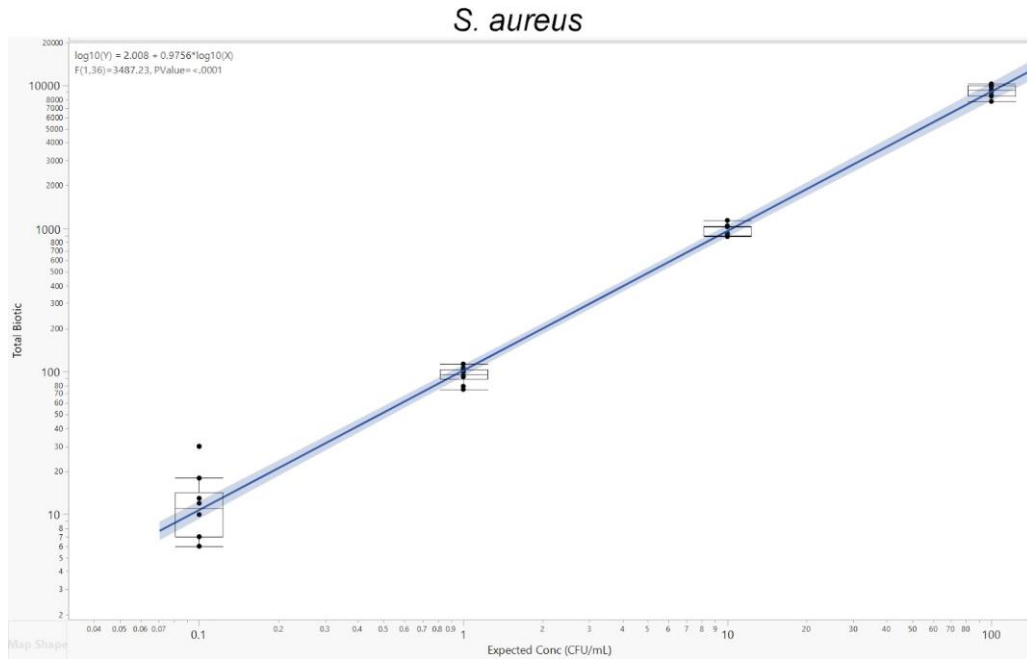


B. subtilis

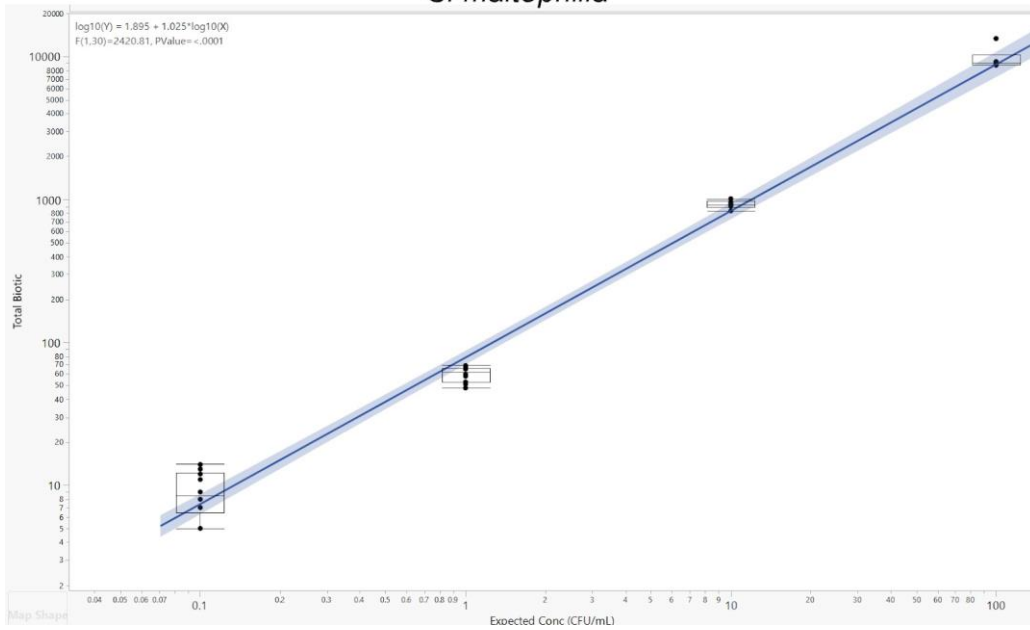




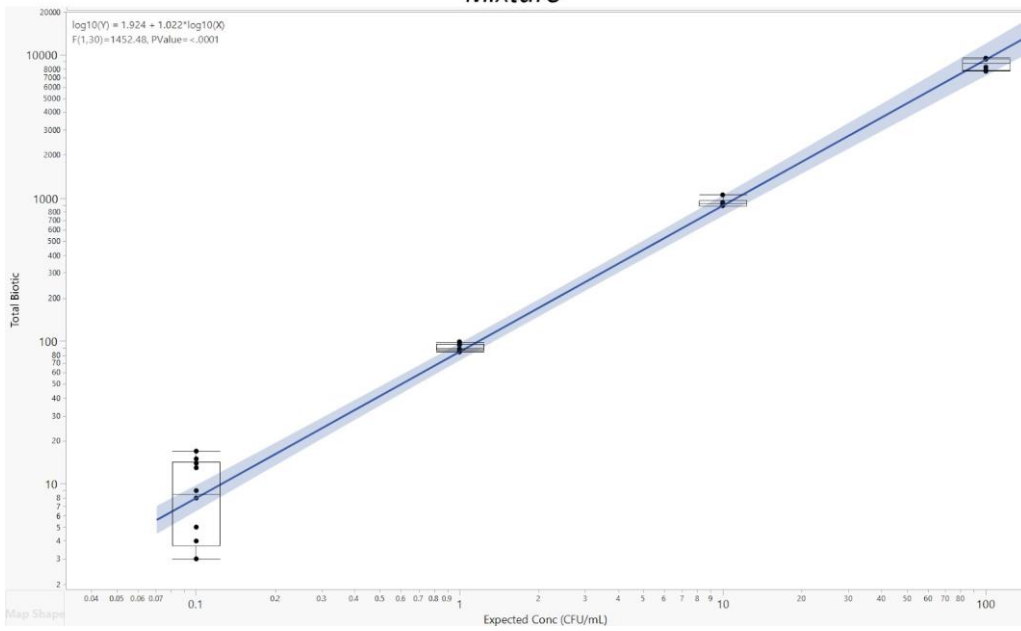




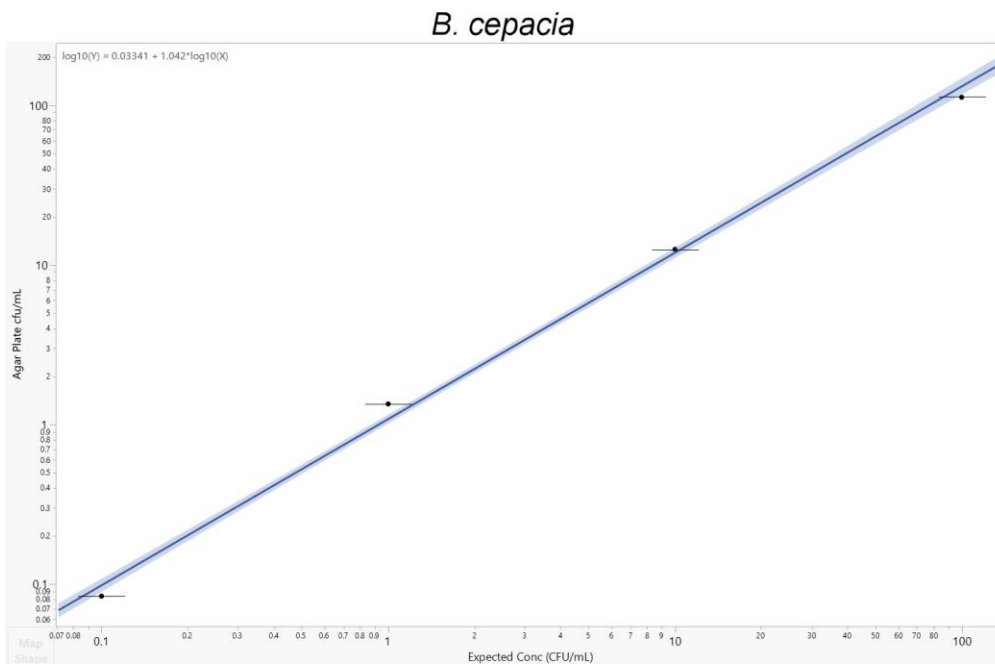
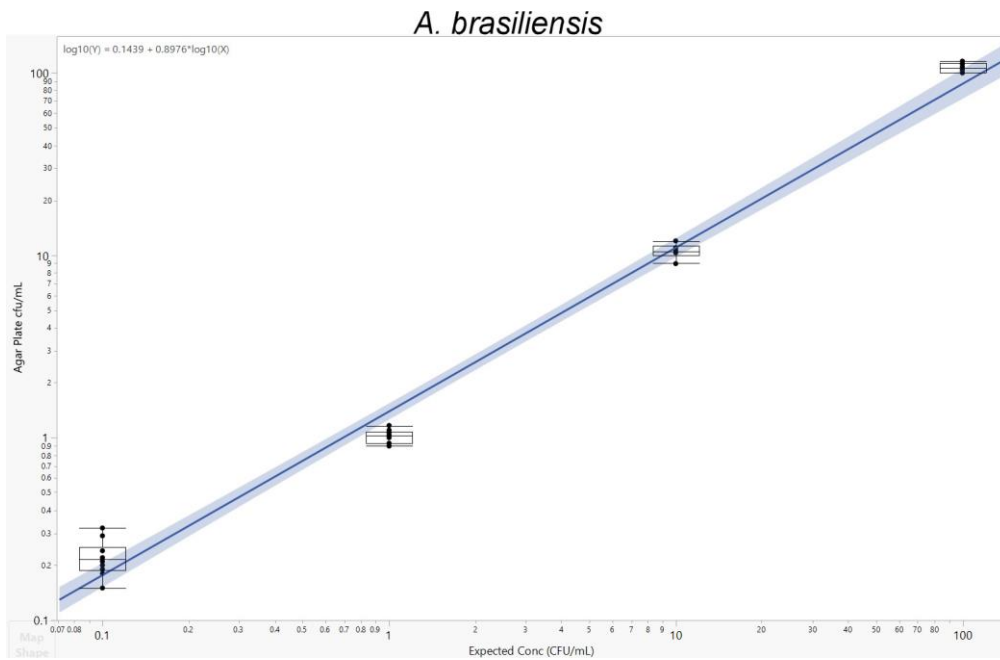
S. maltophilia



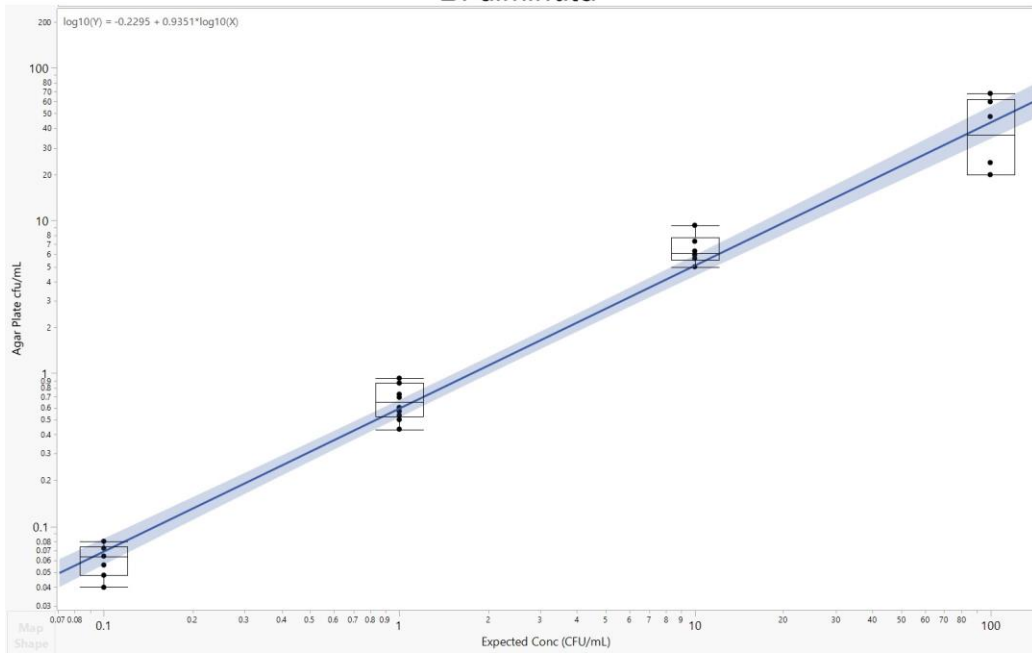
Mixture



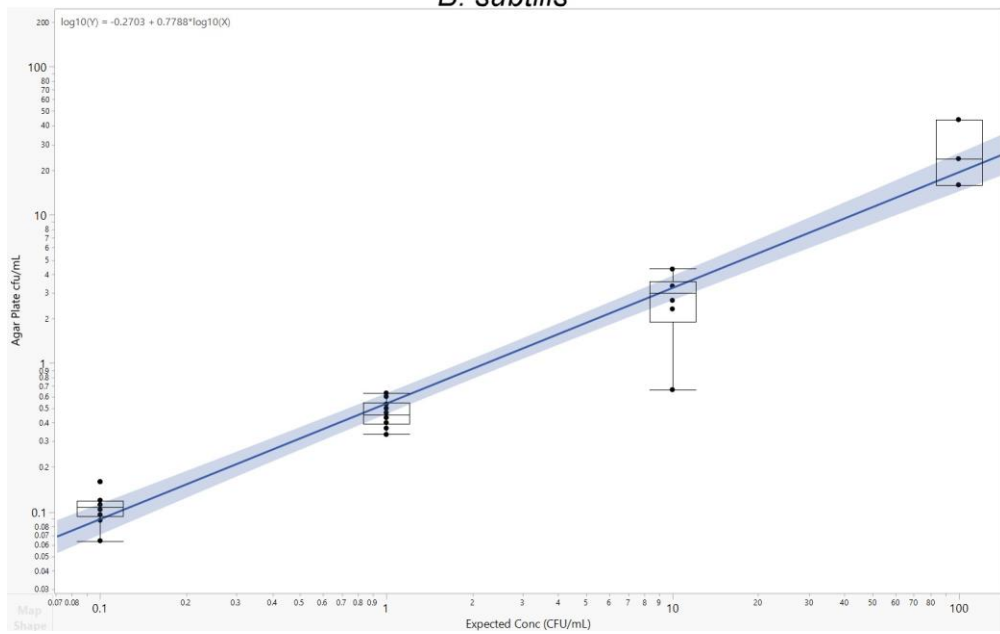
Placas de agar:



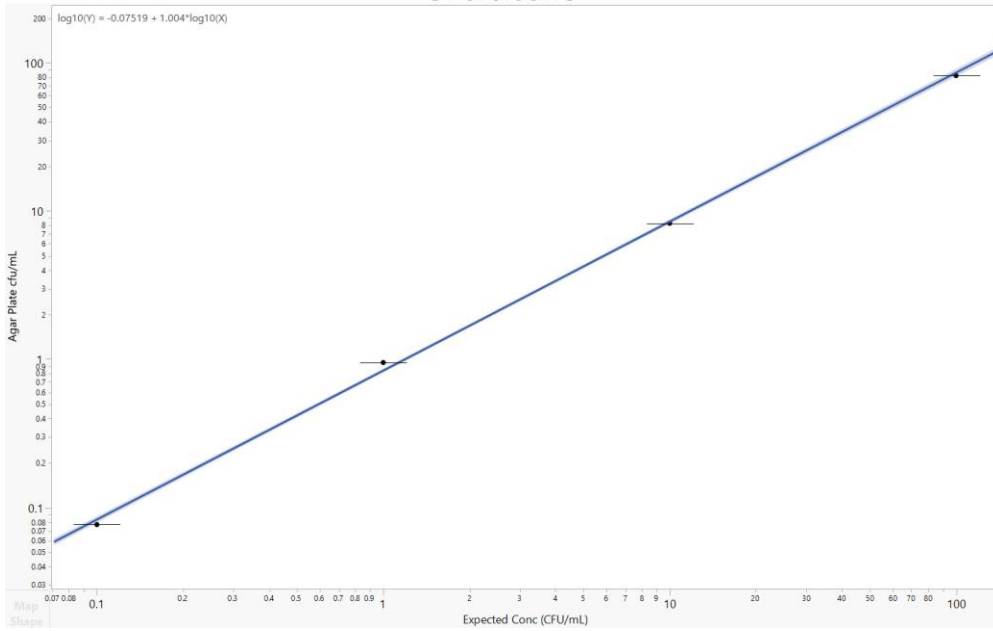
B. diminuta



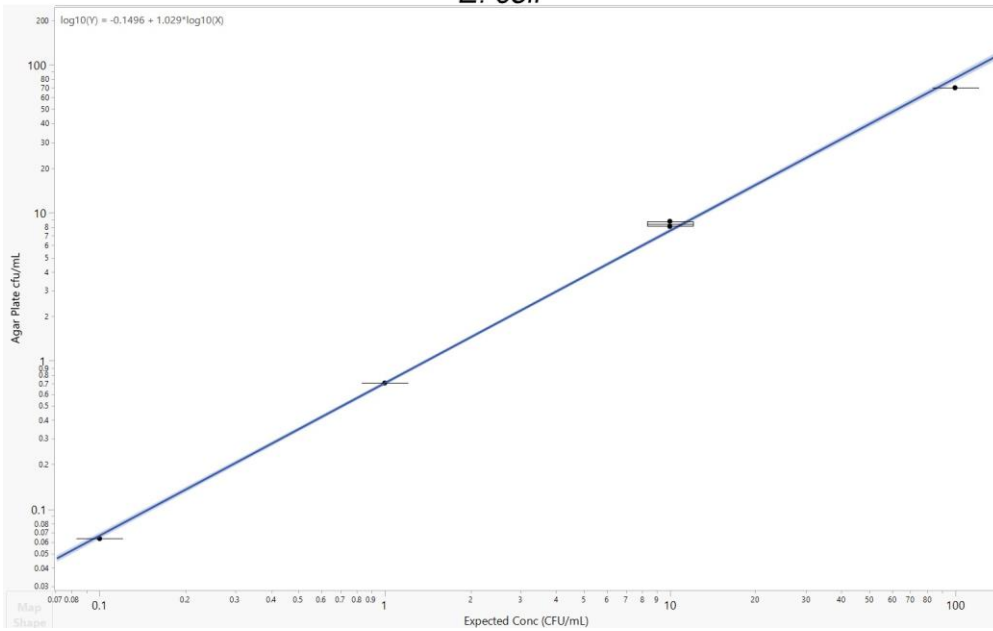
B. subtilis



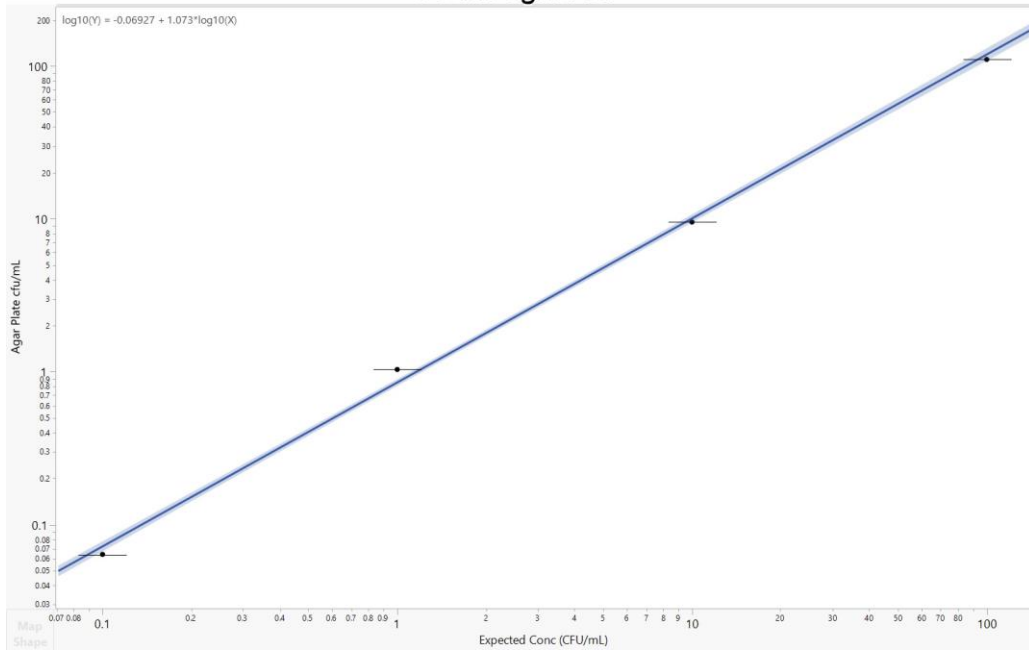
C. albicans



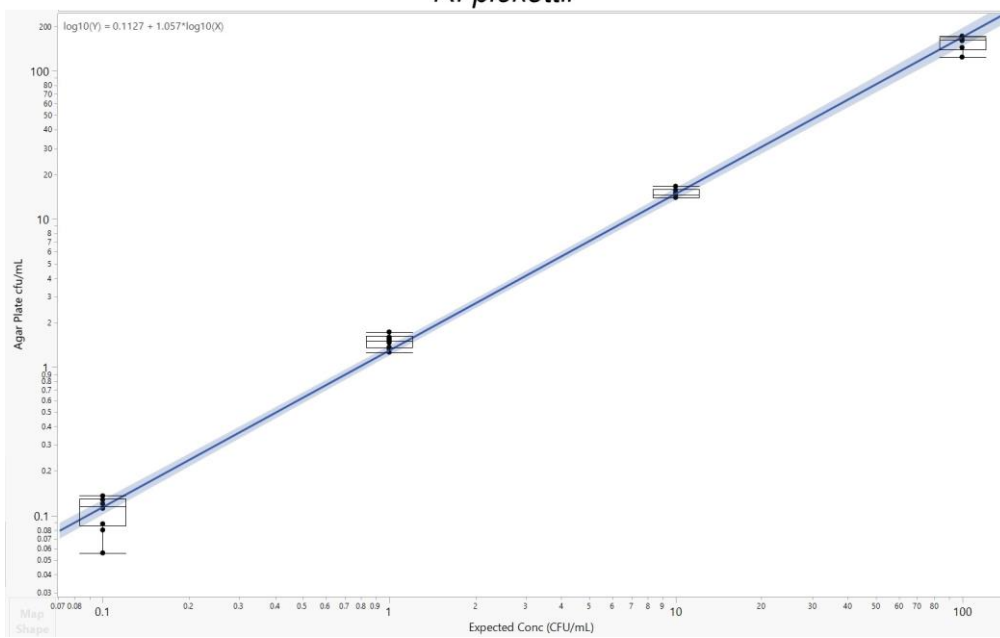
E. coli



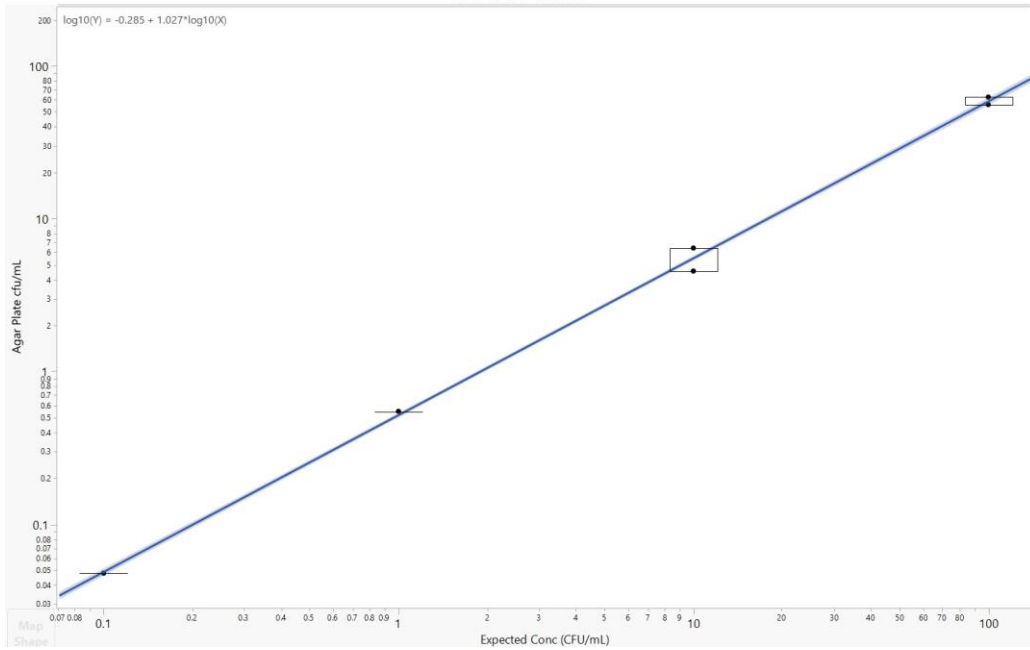
P. aeruginosa



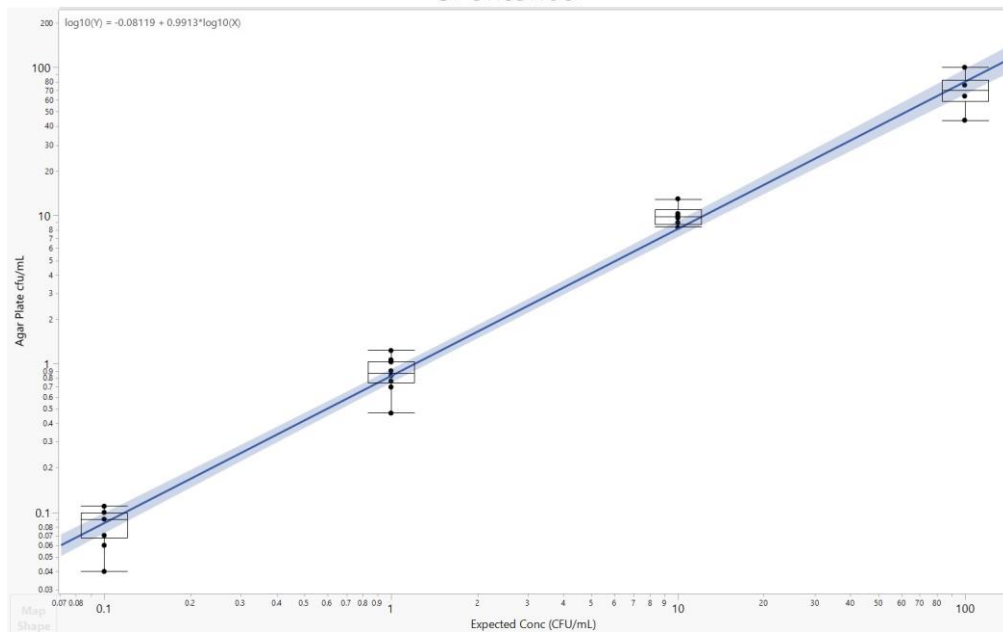
R. pickettii



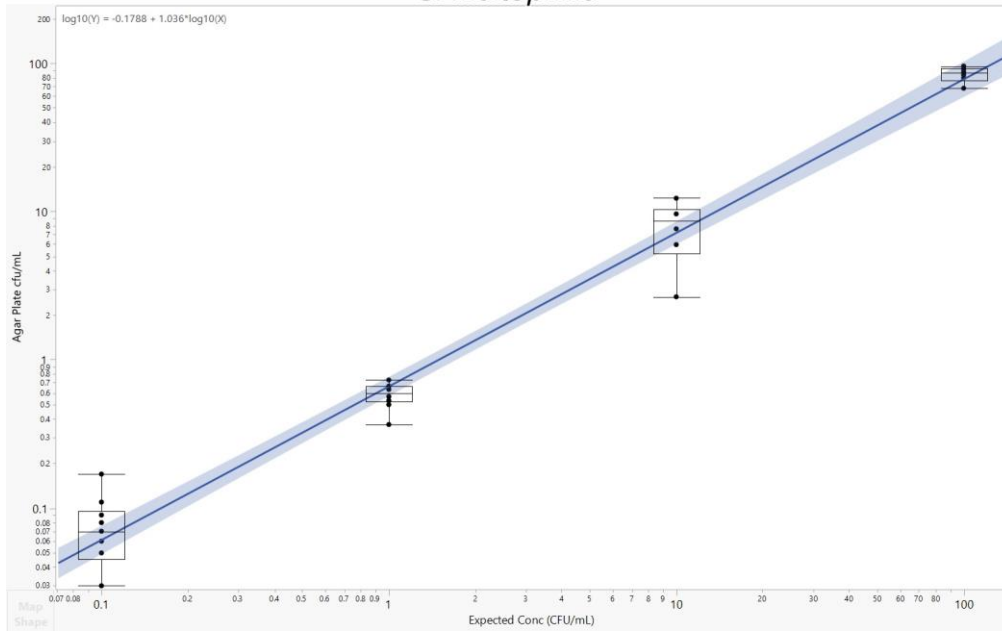
S. aureus



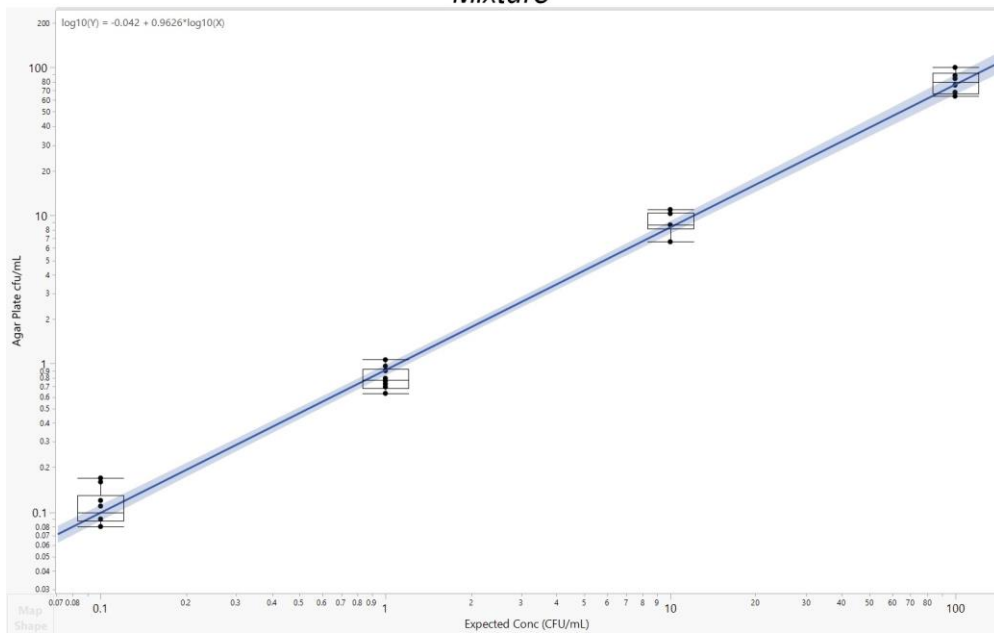
S. enterica



S. maltophilia



Mixture



Exactitud

