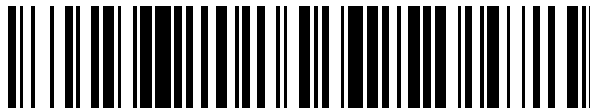


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 544**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2010 E 10718383 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2427567**

54 Título: **Microensayo rápido de esterilidad**

30 Prioridad:

**04.05.2009 US 175271 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.07.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GRAY, JENNIFER CLAIRE;  
STAERK, ALEXANDRA y  
BERCHTOLD, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 540 544 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**Microensayo rápido de esterilidad****Descripción****5 Antecedentes de la invención**

Las regulaciones federales en los Estados Unidos, y regulaciones similares en otros países, requieren pruebas de esterilidad para asegurar que los productos farmacéuticos están sustancialmente libres de microorganismos tales como bacterias y hongos. Se han usado tres métodos generales, prueba de esterilidad por transferencia directa, prueba de esterilidad de filtración por membrana y prueba de esterilidad con descarga de producto, para realizar tales pruebas de esterilidad. Las pruebas de esterilidad tradicionales se realizan con dos medios nutrientes líquidos (caldo de soja tríptico (CST), incubado a 20-25 °C y medio nutriente tioglicolato (MTF), incubado a 30-35 °C) y fluidos de enjuague, y requieren un tiempo de incubación de 14 días. (Véase, por ejemplo, USP <71> "Sterility Tests", foro farmacopeico. USP 30-NF 25 a través del primer suplemento "The United States Pharmacopeial Convention, Inc.), EP 2.1.6 "Sterility" (Farmacopea europea 2.1.6 "Sterility" EP 6ª Edición (2007)) y en otras farmacopeas relevante4s. El medio tioglicolato fluido (MTF) contiene dos fases: la fase inferior del medio líquido es una fase anaeróbica, la fase superior contiene oxígeno para incubación aeróbica.

Generalmente, para probar un producto farmacéutico para esterilidad usando el método de filtración por membrana, un producto farmacéutico o médico líquido, emulsionado o disuelto (por ejemplo, componentes activos, formulaciones parenterales, gotas para ojos, spray nasal y similares) se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 micrones, y la membrana se transfiere al medio apropiado de prueba (MTF o CST) y se incuba durante 14 días. Si crecen microbios en los cultivos, entonces el producto farmacéutico no es estéril y pueden tomarse muestras para identificación microbiológica. La gran cantidad de tiempo requerido para incubación, y también para identificación microbiológica de los organismos que crecen en los cultivos, es desventajoso y puede limitar la disponibilidad de productos farmacéuticos para pacientes que los necesiten. Por ejemplo, en tiempos de crisis médicas, las pruebas de esterilidad que requieren un periodo de incubación de 14 días pueden retrasar la disponibilidad de medicinas o vacunas que pueden reducir o acabar con la crisis. Así, existe una necesidad de un método rápido para probar esterilidad.

**30 Resumen de la invención**

La invención se refiere a un método para probar esterilidad de una composición farmacéutica líquida que comprende las etapas de a) proporcionar una composición farmacéutica filtrable; b) filtrar la composición farmacéutica para proporcionar al menos tres membranas de filtro sobre las cuales se deposita el filtrado de la composición farmacéutica; c) colocar al menos tres membranas de filtro en medios sólidos de cultivo para producir al menos tres cultivos de filtrado; d) cultivar i) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C; ii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C; y iii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C; con la condición de que ninguno de los cultivo de filtrado se cultive durante un periodo superior a aproximadamente 13 días y e) detectar una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en una membrana, donde la presencia de una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en la membrana indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.

El método comprende además una etapa de filtrar una solución de lavado después de que la composición farmacéutica se haya filtrado.

En algunas realizaciones, la membrana es una membrana de polivinilideno fluoruro, membrana de fibra de vidrio, membrana de policarbonato, membrana de tereftalato de polietileno, éteres mezclados de celulosa (acetato de celulosa y nitrato de celulosa), membrana de fosfocelulosa, membrana DEAE, membrana de red de nylon o membrana de politetrafluoroetileno. Preferentemente, la membrana tiene un tamaño de poro de 0,45 µm.

El cultivo sólido de cultivo puede seleccionarse del grupo consistente en MTF-A (medio tioglicolato fluido que contiene 1,075% agar (concentración final)), ICC (agar de infusión de cerebro y corazón), agar anaeróbico Brewer Difco, agar R2A, agar de sangre de Schaedler, agar-caso ICR (agar de soja tríptico), agar Columbia 5% sangre, y agar de sangre anaeróbico CDC.

En algunas realizaciones, el método puede incluir la etapa de cultivar el cultivo de filtrado durante un periodo de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 días.

En algunas realizaciones, una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable se detecta usando un ensayo de luminiscencia, tal como un ensayo de bioluminiscencia que detecta adenosín trifosfato (ATP) producido por una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en la membrana. El ensayo de luminiscencia puede comprender un ensayo de luciferasa.

65

En algunas realizaciones el ensayo de luminiscencia detecta un producto de hibridación de ácido nucleico formado entre una sonda y un ácido nucleico endógeno a un microorganismo. El ensayo de luminiscencia puede comprender una reacción de peroxidasa.

5 En algunas realizaciones, el ensayo de luminiscencia puede detectarse usando una cámara con dispositivo acoplado cargado y software para análisis de imágenes. En algunas realizaciones, el número de células de microorganismos viables, micro-colonias de microorganismos viables o colonias de microorganismos viables pueden cuantificarse o enumerarse.

10 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una composición líquida. La composición líquida puede ser una composición parenteral, una composición oral, una composición nasal, una composición ocular o una vacuna.

15 La invención también se refiere a un método para probar esterilidad de una composición farmacéutica líquida que comprende las etapas de a) proporcionar una composición farmacéutica filtrable; b) filtrar la composición farmacéutica para proporcionar al menos tres membranas de filtro sobre las cuales se deposita el filtrado de la composición farmacéutica; c) colocar al menos tres membranas de filtro en medios sólidos de cultivo para producir al menos tres cultivos de filtrado; d) cultivar i) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C; ii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C; y iii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C; con la condición de que ninguno de los cultivo de filtrado se cultive durante un periodo superior a aproximadamente 13 días; y e) detectar adenosín trifosfato (ATP) en la membrana, donde la presencia de ATP en la membrana indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La FIG. 1 es un gráfico que ilustra los resultados de tratamiento con UV de *M. osloensis* durante un periodo de tiempo de diez minutos. Se muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presente después de cuatros días de incubación. El gráfico muestra más o igual a una reducción de 50% de UFC después de cuatro minutos (3 ciclos).

30 La FIG. 2 es un gráfico que ilustra los resultados de tratamiento con calor de *E. coli* durante un periodo de tiempo de diez minutos. Se muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presente después de cuatros días de incubación. El gráfico muestra más o igual a una reducción de 50% de UFC después de 3 minutos (3 ciclos).

35 La FIG. 3 es un gráfico que ilustra los resultados de tratamiento con producto fármaco parenteral durante un periodo de tiempo de diez minutos. Se muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presente después de cuatros días de incubación. El gráfico muestra más o igual a una reducción de 50% de UFC después de 2 minutos (3 ciclos).

40 La FIG. 4A es una fotomicrografía de células *M. luteus* que se han tratado con calor a 70 °C durante tres minutos. La FIG. 4B es una fotomicrografía de células *M. luteus* no tratadas colocada en placas en agar de soja tríptico después de tres días de incubación a 30-35 °C.

45 La FIG. 5 es un gráfico que ilustra datos de densidad óptica para cultivo *E. coli* no tratado, *E. coli* tratado con calor, *E. coli* tratado con UV y *E. coli* tratado con Voltaren.

50 La FIG. 6 es un gráfico que ilustra datos de densidad óptica para el cultivo *E. coli* no tratado, *E. coli* tratado con calor, *E. coli* tratado con UV y *E. coli* tratado con Voltaren.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra una comparación de curvas de crecimiento de *E. coli* no tratado y *E. coli* tratado con calor. Durante el curso de tres horas el cultivo de *E. coli* tiene una pendiente de 0,2313, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado.

55 La FIG. 8 es un gráfico que muestra una comparación de curvas de crecimiento de *S. aureus* no tratado y *S. aureus* tratado con calor. Durante el curso de cuatro horas, el cultivo de *S. aureus* estresado tiene una pendiente de 0,1070, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado (después de cuatro horas, 0,4034).

60 La FIG. 9 es un gráfico que muestra una comparación de curvas de crecimiento de *C. albicans* no tratado y *C. albicans* tratado con calor. Durante el curso de más de ocho horas, el cultivo de *C. albicans* estresado tiene una pendiente de 0,0419.

65 La FIG. 10 es un gráfico que muestra una comparación de curvas de crecimiento de *B. pumilus* no tratado y *B. pumilus* privado de nutrientes. Las células experimentaron la reducción de nutrientes durante siete días a 2-8 °C. Durante el curso de cinco horas, el cultivo de *B. pumilus* estresado tiene una pendiente de -0,0056, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado.

La FIG. 11 es una fotomicrografía que muestra los resultados de una prueba de fondo de Agar de sangre de Schaedler. Las membranas rápidas MILLIFLEX Rapid MXHVWP124 se incubaron en agar de sangre de Schaedler en casetes MILLIFLEX durante cinco días a 30-35 °C. La FIG. 11A muestra la imagen de MILLIFLEX Rapid, la membrana en este caso se enjuagó con 100mL Fluido A. 11B muestra una membrana enjuagada con 100mL Fluido D.

### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para pruebas de esterilidad que es más rápido que las pruebas convencionales, que requieren un periodo de incubación de 14 días. El método es particularmente adecuado para pruebas rápidas de esterilidad de composiciones líquidas filtrables, tales como composiciones farmacéuticas líquidas (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, composiciones parenterales, composiciones orales, composiciones nasales, composiciones oculares, vacunas). Generalmente, el método incluye filtrar una composición farmacéutica a través de una membrana filtro, la membrana filtro después se transfiere a un medio sólido de cultivo y se incuba bajo condiciones apropiadas de crecimiento durante un tiempo suficiente para permitir microorganismos viables que estén en la membrana para proliferar o producir una cantidad suficiente de una biomolécula, tal como adenosín trifosfato, para permitir la detección de los microorganismos (por ejemplo 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días).

En un aspecto, la invención es un método para pruebas de esterilidad de una composición farmacéutica líquida. El método incluye filtrar una composición farmacéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica líquida) a través de una membrana filtro para proporcionar más de una (por ejemplo, al menos tres) membranas de filtro sobre la que se depositan el filtrado de composición farmacéutica y cualquier microorganismo viable que puede haber en la composición farmacéutica. Si se desea, después puede filtrarse una solución de lavado, por ejemplo, para lavar los inhibidores de crecimiento, inhibidores metabólicos o inhibidores de detección de la membrana, y así facilitar la detección de microorganismos en el filtrado. Las membranas de filtro que contienen el filtrado se colocan en medios sólidos de cultivo para producir al menos tres cultivos de filtrado. Los cultivos de cultivos de filtrado se cultivan después bajo tres condiciones diferentes: condiciones aeróbicas a 20-25 °C, condiciones aeróbicas de 30-35 °C y condiciones anaeróbicas de 30-35 °C durante un periodo de cultivo suficiente para permitir microorganismos viables que están en la membrana de filtro para proliferar o producir una cantidad suficiente de una biomolécula, tal como adenosín trifosfato, para permitir la detección del microorganismo. Generalmente, los cultivos de filtrado se cultivan durante un periodo no superior a aproximadamente 13 días, y preferentemente se cultivan durante un periodo que es sustancialmente inferior a 13 días. Después, los cultivos de filtrados se evalúan para la presencia de una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en una membrana usando cualquier método adecuado. La presencia de una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en la membrana de filtro indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.

En un aspecto de la invención, se proporciona un método para pruebas de esterilidad de una composición farmacéutica líquida, que comprende las etapas de proporcionar una composición farmacéutica filtrable, filtrar la composición para proporcionar al menos tres membranas de filtro sobre las que se depositan el filtrado, colocar las tres membranas en medios sólidos de cultivo para producir tres cultivos de filtrado, cultivando un primer cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C, cultivando un segundo cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C y cultivando un tercer cultivo de filtrado bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C durante un periodo de cultivo no superior a 13 días, y detectar adenosín trifosfato (ATP) en la membrana. La presencia de ATP en una membrana de filtro indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.

Usando la invención puede detectarse una amplia variedad de microorganismos (por ejemplo, levaduras y mohos, bacterias gram-positivas esporulantes, bacterias gram-negativas, cocos gran-positivos y bacilos gram-positivos (tanto microorganismos aeróbicos como anaeróbicos). El método puede usarse para detectar cepas de ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), y también para detectar microorganismos ambientales que puedan contaminar las instalaciones de fabricación. Por ejemplo, como aquí se describe, el método puede usarse para detectar *Aspergillus brasiliensis* ATCCC 16404 (anteriormente conocida como *Aspergillus niger*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Acinetobacter Iwoffii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium afermetans*; *Kocuria spez.*, *Kocuria rhizophilia* (anteriormente conocida como *Micrococcus luteus*), *Moraxella osloensis*, *Penicillium spez.*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus warneri*.

Generalmente, la composición farmacéutica (por ejemplo, composición farmacéutica líquida) se filtra a través de una membrana estéril de filtro o técnica aséptica bajo presión, tal como usando un vacío o presión positiva. Puede usarse cualquier membrana de filtro adecuada y dispositivo de filtro. Ejemplos de membrana de filtro adecuada incluyen, por ejemplo, una membrana de polivinilideno fluoruro, membrana de fibra de vidrio, membrana de policarbonato, membrana de tereftalato de polietileno, ésteres mezclados de celulosa (acetato de celulosa y nitrato de celulosa), membrana de fosfocelulosa, membrana DEAE, membrana de red de nylon o membrana de politetrafluoroetileno. Preferentemente, la membrana está hecha de PVDF (fluoruro de polivinilideno). La membrana

de filtro adecuada para su uso en la invención reivindicada tiene un tamaño de poro que es suficientemente pequeño para mantener a los microorganismos que puedan estar presentes en la composición farmacéutica, tal como un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 micrones ( $\mu\text{m}$ ) a aproximadamente 20 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 15 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 12 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 10 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 8 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 6 micrones, desde aproximadamente 0,1 micrones a aproximadamente 5 micrones, 0,4 micrones – 12 micrones, 0,4 micrones – 10 micrones, 0,4 micrones – 8 micrones, 0,4 micrones – 6 micrones, aproximadamente 0,22 micrones o aproximadamente 0,45 micrones. Preferentemente, el filtro de membrana tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,45 micrones.

Generalmente se preparan al menos tres membranas de filtro que contienen filtrado. Esto puede realizarse filtrando tres muestras separadas de la composición farmacéutica a través de tres membranas separadas de filtro. Esto puede realizarse preparando una membrana de filtro que contiene un filtrado de de composición farmacéutica y cortando o dividiendo el filtrado, usando una técnica estéril o aséptica, en tres porciones (por ejemplo, tres porciones de aproximadamente igual tamaño). Las membranas de filtro que contienen el filtrado de composición farmacéutica se colocan después en un medio sólido adecuado de cultivo para producir los cultivos de filtrado.

Pueden seleccionarse adecuado medios sólidos de cultivo y condiciones de cultivo que permitan el crecimiento y/o metabolismo de un microorganismo deseado que se detectará. Esto puede realizarse, por ejemplo, analizando medios de cultivo, como aquí se describe y ejemplifica. Preferentemente, los medios sólidos de cultivo usados en el método permitirán el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos bajo condiciones de cultivo aeróbicas y anaeróbicas. Si se desea, puede usarse más de un medio sólido de cultivo. Por ejemplo, puede usarse un primer medio de cultivo que sea equivalente o mejor a caldo de soja triptico para crecimiento de levaduras, mohos y bacterias aeróbicas; puede seleccionarse un segundo medio de cultivo que sea equivalente o mejor a la fase anaeróbica de medio tioglicolato fluido para crecimiento de microorganismos aeróbicos. Preferentemente, se usa un único medio sólido de cultivo bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Medios sólidos adecuados de cultivo que pueden usarse en la invención incluyen, por ejemplo, MTF-A (medio tioglicolato fluido que contiene 1,075% agar (concentración final)), ICC (agar de infusión de cerebro y corazón), agar anaeróbico Brewer Difco, agar R2A, agar de sangre de Schaedler, agar-caso ICR (agar de soja triptico), agar Columbia 5% sangre, y agar de sangre anaeróbico CDC. Agar de sangre de Schaedler es un medio sólido de cultivo particularmente preferente para su uso en el método.

Los medios sólidos adecuados de cultivo son adecuados para permitir crecimiento y/o metabolismo de microorganismos “estresados” y “no estresados”, como aquí se describe. Esto es deseable porque los microorganismos que han experimentado tensión, por ejemplo tensión hipotónica o hipertónica, radiación (tal como luz UV, radiación gamma, microondas), ultrasonido, calor, temperatura baja o tensión química (evocada por ejemplo por cloro o productos de medicinas farmacéuticas), durante química de proceso, tal como durante la fabricación de una composición farmacéutica.

Los cultivos de filtrado se incuban (por ejemplo, se cultivan) bajo condiciones apropiadas de crecimiento durante un periodo de tiempo que es suficiente para permitir que los microorganismos viables que están en la membrana proliferen para producir micro-colonias o colonias, o para producir una cantidad suficiente de una biomolécula, tal como adenosín trifosfato, para permitir la detección del microorganismo. Generalmente, un cultivo de filtrado se incuba bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C, un segundo filtrado se incuba bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C y un tercer filtrado se incuba bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C.

En algunas realizaciones, los cultivos de filtrado se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que microorganismos viables produzcan una cantidad detectable de ATP, tal como al menos aproximadamente 200 atomoles de ATP, al menos aproximadamente 200 femtomoles de ATP, al menos aproximadamente 200 picomoles de ATP, o al menos aproximadamente 200 nanomoles de ATP. El periodo de cultivo puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 9 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 11 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 días, de aproximadamente 2 a aproximadamente 13 días, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días o aproximadamente 6 días. El periodo de incubación para cada cultivo de filtrado individual puede variar como sea apropiado, y no todos los cultivos de filtrado necesitan cultivarse durante la misma cantidad de tiempo. El tiempo de incubación preferente variará en base al microorganismo que se detectará.

Una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable presente en una membrana de filtro después de la incubación de un cultivo de filtrado puede detectarse usando cualquier método adecuado, tal como mediante inspección visual o preferentemente usando un ensayo adecuado. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de luminiscencia (por ejemplo, ensayo con luciferasa) para detectar una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable. Puede usarse cualquier método o sistema adecuado para detectar luminiscencia, tal como una cámara con dispositivo acoplado cargado, procesador de imágenes y/o software para análisis de imágenes.

Ventajosamente, el software para análisis de imágenes puede usarse para cuantificar o enumerar el número de células de microorganismos viables, micro-colonias de microorganismos viables o colonias de microorganismos viables. En algunas realizaciones, el ensayo de luminiscencia, tal como un ensayo de luciferasa, se usa para detectar adenosín trifosfato (ATP) que se produce por la célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable presente en la membrana de filtro. Por ejemplo, un reactivo que libera ATP y un agente bioluminiscente (por ejemplo, un reactivo que contiene luciferasa y luciferina) se aplican a las membranas de filtro y la luminiscencia ocurre si las células viable producen ATP. Tales reactivos para detectar ATP mediante luminiscencia son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado (por ejemplo, kit reactivo rápido MILLIFLEX; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts).

Una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable presente en una membrana de filtro después de incubación de un cultivo de filtrado también puede detectarse, por ejemplo, usando un ensayo de luminiscencia para detectar hibridización de una sonda que hibridizará con un ácido nucleico endógeno a un microorganismos. El ensayo de luminiscencia puede comprender una reacción de peroxidasa u otra reacción adecuada. Los reactivos adecuados para producir luminiscencia a través de la actividad de peroxidasa y otras enzimas son bien conocidos y están disponibles en el mercado.

Puede usarse un ensayo y sistema de detección que permita que se detecten aproximadamente 10-1000 células de levadura o aproximadamente 1000 células bacterianas. Preferentemente, se usa un ensayo y sistema de detección que permita detectar una única célula o tan pocas como aproximadamente 100 células. Esto puede conseguirse, por ejemplo, detectando ATP producido por un microorganismo. Por ejemplo, un ensayo de bioluminiscencia ATP disponible en el mercado, cuando se usa en combinación con una cámara con dispositivo acoplado cargado, procesador de imágenes y software para análisis de imágenes (sistema de detección y enumeración rápido de microbiología MILLIFLEX; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) puede usarse para detectar aproximadamente 100 atomoles de ATP, que es equivalente a aproximadamente 1 célula de levadura o moho o aproximadamente 100 células bacterianas.

El método de detección aquí descrito es adecuado para analizar la esterilidad de composiciones filtrables, tal como composiciones farmacéuticas líquidas. Las composiciones líquidas incluyen composiciones acuosas, suspensiones y emulsiones. La composición farmacéutica líquida puede ser cualquier líquido adecuado para uso farmacéutico, incluyendo, por ejemplo, una composición parenteral, una composición oral, una composición nasal, o una composición ocular. La composición líquida puede ser una vacuna.

Las vacunas adecuadas incluyen, por ejemplo, vacuna de ántrax (ANT), vacuna de tuberculosis Bacile Calmette-Guerin (BCG), vacuna proteínas A de superficie exterior de Borrelia (BORospA), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos (DT), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis (DTP), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular para uso pediátrico (DTPa), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular para uso en adultos (DrTPar), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular y Haemophilus influenzae tipo b conjugado (DTPa-HIB), vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular y Haemophilus influenzae tipo b conjugado y poliovirus inactivado (DTPa-HIB-IPV), vacuna de virus de hepatitis A (VHA), vacuna de virus de hepatitis A y hepatitis B (VHA-VHB), vacuna de virus de hepatitis B (VHB), vacuna de Haemophilus influenzae tipo b conjugado (HIBcn), vacuna de polisacárido de Haemophilus influenzae tipo b (HIBps), vacuna de Haemophilus influenzae tipo b (conjugado de proteína de difteria CRRM197, oligosacáridos conjugados con proteína de toxina de difteria CRM197; HIB-HbOC)), vacuna de virus de influenza (INF) incluyendo vacunas para influenza aviar (por ejemplo, H5N1, H1N3) e influenza porcina (por ejemplo, H1N1), vacuna viva atenuada por virus de influenza (INFa), vacuna intranasal atenuada por virus de influenza (INFan), vacuna inactiva por virus de influenza (INFi), virión partido de vacuna inactivada por virus de influenza (INFs), tipos A y B trivalentes de virión partido de vacuna inactivada por virus de influenza (INFs-AB3), virión entero de vacuna inactivada por virus de influenza (INFw), vacuna inactivada por poliovirus (IPV), vacuna meningocócica (Neisseria meningitidis) (MEN), vacuna conjugada meningocócica (Neisseria meningitidis) (MENcn), serogrupos A, C de vacuna conjugada meningocócica (Neisseria meningitidis) (MENcn-AC), serogrupos A, C, Y, W-135 de polisacárido meningocócico (Neisseria meningitidis) (MENps-ASYW), vacuna de virus de sarampión, virus de paperas, virus de rubeola (MMR), vacunas de ), vacuna de virus de sarampión, virus de paperas, virus de rubeola y virus de varicela (MMR-VAR), vacuna trivalente oral viva atenuada por poliovirus (OPV), vacuna neumocócica (Streptococcus pneumoniae) (PNU), vacuna 7-valente conjugada neumocócica (Streptococcus pneumoniae) (PNUcn-7), vacuna 23-valente de polisacárido neumocócico (Streptococcus pneumoniae) (PNUps-23), vacuna de poliovirus (POL), vacuna de rabia (RAB), cultivo celular diploide humano de vacuna de rabia (RAB-HDCV), cultivo celular de embrión de pollo purificado de vacuna de rabia (RAB-PCEC), vacuna de virus sincitial respiratorio (RSV), vacuna de viruela (SMA), vacuna de viruela (virus vacuna) (SMAvac), vacuna de toxoide de tétano y toxoide de difteria (cantidad reducida de antígeno para adultos) (Td), vacuna de toxoplasmosis (toxoplasma gondii) (TOX), vacuna tifoidea (Salmonella typhi), cepa Ty21a viva atenuada por vacuna tifoidea (Salmonella typhi) (TPDa), seca inactivada por calor y fenol de vacuna tifoidea (Salmonella typhi) (TPD-HP), polisacárido capsular VI de vacuna tifoidea (Salmonella typhi) (TPD-Vi), vacuna de tuberculosis (mycobacterium tuberculosis), no BCG (TUB, vacuna de varicela (varicela, virus de varicela zóster) (VAR).

Las composiciones parenterales adecuadas incluyen, por ejemplo, adenosina, alprostadiil, sulfato de ampicilina, acitromicina, bleomicina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cisplatina, dacarbazina, daunorubicina HCL, deferoxamina mesilato, acetato de desmopresina, diltiazem, dipiridamol, doxorubicina, enalaprilat, epirubicina, sodio de epoprostenol, fluxonazol, fosfato de fludarabina, flumazenil, granisetron HCL, idarubicin HCL, ifosfamida, irinotecan HCL, calcio de leucovorin, acetato de leuprorelin, levocarnitina, acetato de medroxiprogesterona, mesna, acetato de metilprednisolona, metoclopramida, mitoxantrona, nalfufina HCL, bitartrato de norefinefrina, acetato de octreotrida, onansetron, oxaliplatina, oxitocina, paclitaxel, disodio de pamidronato, bromuro de pancuronio, bromuro de fenilefrina, fenilefrina HCL, prometazina HCL, propofol, bromuro de rocuronio, sulfatometoxazol, succinato de sumatriptan, sulfato de tebutalina, cipionato de testosterona, tobramicina, bromuro de vecuronio, sulfato de vincristina, tartrato de vinorelbina y polvo estéril de estreptozocina.

Las composiciones orales adecuadas incluyen, por ejemplo, pastillas de acetaminofeno y fosfato de codeína, pastillas de acetaminofeno acetazolamida, cápsulas de aciclovir, cápsulas de amilorida HCL, amiodarona HCL, cápsulas de amlodipina besilato y benazepril, pastillas amlodipina beilato, amoxicilina y clavulanato de potasio, amoxicilina, anagrelida, desogestrel y pastillas de etinil estradiol, aspirina, atenolol, levonorgestrel y pastillas de etinil estradiol, baclofeno, benazepril HCL, benzonatato, mesilato de bencotropina, valerato de betametasona, dipropionato de betametasona, cloruro de betanecol, bicalutamida, fumarato de bisopropol, bupropión HCL, suspensión para inhalación de budesonida, butemanida, bupropión HCL, cabergolina, carcarb 600, calcitriol, pastillas de citrato de calcio, pastillas de noretindrona, pastillas de captopril e hidrocortizida, captopril, carbamazepina, carvedilo, cefaclor, cefadroxil, cefdinir, cefprozil, cepalexina, certagen, certirizina HCL, clordiazepóxido HCL, maleato de clorfeniramina, clorzoxazona, colinoide, cilostazol, cimetidina HCL, cimetina, ciprofloxacina, citalopram, isotretinoína, claritromicina, fumarato de clemastina, clindamicina, citrato de clomifeno, clomipramina HCL, clonazepam, clotrimazol, clozapina, cromolín de sodio, ciclobenzaprina HCL, ciclosporina, ciproheptadina HCL, danazol, demeclociclina HCL, acetato de desmopresina, dexmetilfenidato HCL, sulfato de dextroanfetamina, diazepam, diclofenac de potasio, dicloxacilina, didanosina, diltiazem HCL, difenidramina HCL, dipiridamol, fosfato de disopirramida, divalproex de sodio, dorzolamida HCL, mesilato de doxazosin, maleato de enalapril, carbamazepina, estazolam, estradiol, estropipato, etanbutol HCL, etosuximida, etodolac, famciclovir, famotidina, sulfato ferroso, fexofenadina HCL, finasterida, acetato de flecainida, fluconazol, acetato de fludrocortisona, fluocinodina, fluoxetina, flurbiprofeno, flutamida, fluvoxamina, fosinopril de sodio, furosemda, gabapentina, hidrobromuro de galantamina, gemfibrozil, glimepirida, glipezida, sulfato de glucosamina, gliburido, haloperidol, hidralazina HCL, hidrocortizida, bitartrato de hidrocondona, sulfato de hidroxicloraquina, hidroxidona, hidroxizina HCL, pamoato de hidroxizina, indometacina, isoniazid, ketoconazol, ketoprofeno, ketorolac trometamina, labetalol HCL, lamotrigina, lansoprazol, leflunomida, leucovorin de calcio, levetiracetam, lidocaína HCL, lisinopril, loperamida HCL, lorazepam, losartán potásico, lovastatina, mebendazol, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, meloxicam, meperidina HCL, mercaptopurina, mesalamina, metformina HCL, metotrexato, metildopa, metilprednisolona, metoclopramida, tartrato de metopropol, metronidazol, metronidazol, mexiletina, minociclina HCL, mirtzapina, misoprostol, moeipril HCL, mupirocina, micofenolato mofetil, niacina, nifedipina, nimodipina, nizatidina, acetato de noretindrona, nortriptilina HCL, nistatina, ofloxacina, omeprazol, ondansetron HCL, oxaprozina, oxazepam, cloruro de oxibutinina, oxicodona, oxicodona HCL, pantoprazol de sodio, paroxetina, penicilina V de potasio, pentoxifilina, fenilgésico, piroxicam, dihidrocloruro de pramipexol, pravastatina de sodio, prazosin HCL, prednisolona, maleato de proclorperazina, propafenona HCL, propoxifeno HCL, propranolol HCL, protriptilina HCL, quinapril, sulfato de quinidina, ramipril, ranitidina HCL, ribavirina, risperidona, ropinirol HCL, senna-S, sennagen, nitrato de plata, simvastatina, solatol HCL, sucralfato, citrato de tamoxifeno, tamsulosina HCL, terzosina HCL, terbinafina HCL, tetraciclina HCL, teofilina, ticopridina HCL, tometina de sodio, topiramato, torsemida, tramadol HCL, tandolapril, trazodona HCL, tretinoína, ursodiol, ácido valproico, venlafaxina HCL, verapamil HCL, warfarina de sodio, zaleplon y tartrato de zoldipem,

Las composiciones nasales adecuadas incluyen, por ejemplo, sprays nasales, medicamentos anti-migraña, medicamentos peptídicos (tratamiento con hormonas), anestésicos, antieméticos, sedantes, hidrocloreuro de azelastina, hidrocloreuro de oximetazolina, hidrocloreuro de fenileferina, solución salina, furoato de mometasona, budesonida, bromuro de ipratropio y spray nasal de cromolín sódico.

Las composiciones oculares adecuadas incluyen, por ejemplo, lidocaína, proparacaína, tetracaína, solución oftalmológica de trometamina ketorolaco, trometamina ketorolaco, napazolina oftalmológica, brimonidina, azitromicina, bespotastina besilato, besifloxacina, betaxon, cosopt, diflupredato, lotemax, ranibizumab, bimatoprost, pegaptanib, ofloxacina, desametasona, levofloxacina, solución oftalmológica de unoprostona isopropilo, emulsión oftalmológica de ciclosporina, salgeno, solución oftalmológica de travoprost, valganciclovir HCL, viroptic, cidofovir, verteporfin, vitrasert, vitravene y solución oftalmológica de ketotifeno fumarato.

El método aquí descrito puede realizarse usando cualquier equipo o aparato adecuado, y puede ser manual o automático. En un aspecto preferente, el método se realiza usando el sistema de detección rápida de microbiología MILLIFEX disponible en el mercado, que comprende una estación de preparación de muestra, una estación de autopulverización, torre de detección, analizador de imagen, cámara CCD y ordenador con software (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts).

65

En otro aspecto, la invención es una composición farmacéutica estéril (por ejemplo, una vacuna, una composición ocular, una composición nasal, una composición oral, una composición parenteral), que se ha analizado para microorganismos viables usando los métodos aquí descritos.

5 **EJEMPLIFICACIÓN**

Creación de crio-colección de cepas ATCC y cepas ambientales de sitio de producción (placas en contacto con la superficie y el personal de producción, contaminación de biocarga y pruebas de esterilidad).

10 Procedentes de cultivo liofilizado (cepas ATCC) o directamente de placa (aislados ambientales) los microorganismos se cultivaron en caldo de soja tríptico líquido o en medio sólido (por ejemplo, en agar dextrosa Sabouraud) durante un periodo de tiempo apropiado. La identificación genotípica de cada cepa se realizó usando el Sistema MicroSeq, Applied Biosistemas. El cultivo después se centrifugó a 800 x G durante 20-30 minutos y el gránulo se volvió a suspender en medio protector (Oxoid-CM67 que contenía 15% glicerina). El cultivo se diluyó, se  
15 comprobaron las UFC (unidades formadoras de colonias) en medio sólido y se llenaron en Viales de 2 mL Nunc Cryotube™, almacenados a -89 °C. La Tabla 1 muestra la lista completa de microorganismos usados.

Tabla 1

Levaduras/Mohos	Bacterias esporulantes gram-positivas	Bacterias gram-negativas	Cocos gram-positivos	Bacilos gram-positivos
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Propionibacterium acnes</i> HK-WST
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>B. licheniformis</i> HK-WST (2006)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Kocuria spez.</i> HK-WST	<i>C. afermentans</i> HK-WST
<i>Penicilium spez.</i> HK-WST	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	<i>Acinetobacter Lwoffii</i> HK-WST (2005)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> HK-WST	
	<i>Bacillus clausii</i> HK-WST	<i>Moraxela osloensis</i> HK-WST	<i>Staphylococcus warneri</i> HK-WST	
	<i>Bacillus pumilus</i> HK-WST		<i>S. capitis</i> HK-WST	
	<i>Bacillus sphaericus</i> HK-WST		<i>Micrococcus luteus</i> HK-WST	
	<i>Bacillus idriensis</i> HK-WST			

A. Estudio del factor de tensión

45 Se evocó tensión por la aplicación de luz UV (240-250µW/cm<sup>2</sup>), calor (50-70 °C en un baño de agua) o incubando los microorganismos en una serie de diluciones de un producto medicamento parenteral durante 1-10 minutos cada uno, tomando alícuotas cada minuto. La tensión se aplicó directamente a una suspensión fluida de los microorganismos probados en un rango inferior a 100 UFC. Los efectos de la tensión se controlaron disminuyendo las UFC, se determinaron con un método de conteo de placas y mediciones OD.

50 Conteo de placas: los microorganismos estresados se colocaron en placas en agar de soja tríptico controlando los diferentes efectos de tensión (tensión aplicada durante 1-10 minutos, tomando alícuotas cada minuto), sacando las alícuotas de la placa cada minuto. Los resultados se contaron después de 2-7 días (dependiendo de la cepa, por ejemplo, *E. coli* y *A. niger* se contaron después de dos días, la última *P. acnes* no se pudo contar antes que después de 6 días de incubación. Se midió el tiempo exacto necesario para llevar a una  
55 disminución de la cantidad inicialmente inoculada de UFC de más de 50%.

La medición OD (λ=600 nm): Durante la noche - primero se estresaron los cultivos de los microorganismos probados (se aplicaron los parámetros de tensión que se determinaron en el estudio ≥50% reducción), se inoculó  
60 caldo de soja tríptico o medio tioglicolato fluido (aproximadamente 3-4 x 10<sup>6</sup> UFC/ml) y se analizaron durante un periodo de tiempo de hasta 8 horas (tomando alícuotas para medir densidad óptica cada hora). La incubación tuvo lugar en una tabla con temblor (solamente las cepas aeróbicas). Los cultivos estresados se compararon con los cultivos no estresados.

65 Resultados de reducción de 50% del estudio de factor de tensión



Para cada microorganismo de 22 cepas, se probaron 3 parámetros de tensión. Se midió el parámetro exacto (entre 1 y 10 minutos) de cada factor de tensión, que fue necesario para llevar a reducir la cantidad inicialmente inoculada de UFC de más de 50%. Los tres parámetros probados fueron luz UV, calor e incubación de los microorganismos en un producto medicamento parenteral para aplicación parenteral. El calor, por ejemplo, causa daño en membranas citoplásmicas, ARN se desnaturaliza y esto lleva a la muerte de algunas células. La radiación UV provoca mutaciones y una parada de réplica de ADN (M. Strus, Rocznik Panstw Zakl Higij, 48 (3): 263-268 (1997)).

La aplicación de un producto medicamento parenteral lleva a una tensión química en las células microbianas, las propiedades antimicrobianas del producto medicamento parenteral se han conocido durante mucho tiempo. Las FIGS. 1-3 dan ejemplo de los datos obtenidos para *Moraxella osloensis*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter lwooffii*. Para cada una de las 22 cepas de microorganismos se encontró el parámetro de tensión necesario para reducir el inóculo inicial en  $\geq 50\%$ .

Las observaciones de morfología cambiada de colonia (colonias crecieron más despacio, pero después recuperaron el tamaño normal de colonia) se hicieron en algunos casos. Por ejemplo, *Micrococcus luteus* mostró una reducción en el tamaño de colonia [FIGS. 4a y 4b].

Para evaluación de medio de cultivo de la prueba rápida de esterilidad fue importante no solamente usar una amplia variedad de microorganismos, sino también usar estos microorganismos en un estado estresado. Algunos factores de tensión, tales como tensión química causada por un producto medicamento parenteral y tensión de radiación causada por la aplicación de luz UV diezmaron la cantidad de microorganismos inoculados. Sin embargo, un tratamiento con calor llevó a un índice de crecimiento inicialmente reducido en algunos de los microorganismos analizados. Ya se ha presentado que las células lesionadas con calor tardan un tiempo en recuperarse, de 3 a 4 horas, esto se confirmó en este estudio (M. Warseck, Appl. Microbiol., 26: 919-922 (1973)). La tensión con calor no es útil para bacterias esporulantes, al igual que otros parámetros de tensión no son factibles como bacterias esporulantes y muestran una amplia resistencia hacia la tensión (P. Setlow, J. Appl. Microbiol., 101 (3): 514-525 Revista (2006)). Por ejemplo *B. pumilus* se usa como una bacteria indicadora de radiación (J. Wong, PDA J Pharm Sci Technol. 58 (1):6-14 (2004)). En el caso de la bacteria esporulante, se usó un factor de "tensión" diferente – estos se usaron mediante reducción de nutrientes y por lo tanto se indujo un contenido más alto de esporas.

La posterior evaluación de medio de nutrientes y el análisis estadístico reveló que el agar de sangre de Schaedler fue el mejor medio sólido para su uso en una prueba de esterilidad. La prueba t para analizar las diferencias entre incubación aeróbica a 20-25° y a 30-35 °C demostró que hay una diferencia significativa entre las temperaturas. Como la diferencia fue significativa en 11 de 40 casos es necesario validar ambas temperaturas de incubación en la prueba rápida de esterilidad.

#### Medición OD

Los parámetros de tensión que se determinaron en el estudio de reducción de  $\geq 50\%$  se aplicaron a cada cepa analizada. Los inóculos estresados siempre se compararon con el inóculo no estresado. Los microorganismos (aproximadamente 3-4 x 10<sup>6</sup> UFC/ml como inóculo inicial) se incubaron en caldo de soja tréptico o medio tioglicolato fluido y se incubaron en una mesa con agitación a 30-35 °C (solamente las cepas aeróbicas). Las alícuotas se tomaron cada hora en se midió la densidad óptica ( $\lambda=600\text{nm}$ ). Los datos obtenidos para los inóculos tratados de manera diferente (no tratados, tratados con calor, tratados con luz UV diluidos en un producto medicamento parenteral, tiempo/parámetro usado de los experimentos con reducción de 50%) mostraron una curva de crecimiento ligeramente diferente en el gráfico de los datos medidos OD [FIG. 5].

El trazo de los datos de manera logarítmica [FIG. 6] muestra una influencia del tratamiento con claro en las curvas de crecimiento de *E. coli* y hace que los datos sean independientes de la cantidad de inóculo. Y esto precisamente no es fácil de controlar, el gráfico logarítmico tiene esto como una ventaja. No hay una verdadera diferencia en crecimiento observado cuando el cultivo bacteriano se tensa bien mediante luz UV o mediante tratamiento con producto medicamento parenteral (con los parámetros determinados en experimentos con reducción de  $\leq 50\%$ ).

La comparación de las curvas muestra que solamente en tratamiento con calor (parámetros como los determinados en experimentos con reducción de 50%) tuvo una influencia en el índice de crecimiento de microorganismos y los microorganismos mostraron una tensión real. La luz UV y la dilución en un producto medicamento parenteral (ambos "factores de eliminación" y no "factores de tensión") no se usaron durante la evaluación del medio de cultivo. La tensión en el índice de crecimiento se muestra mejor con detalle aplicando una línea recta y comparando las pendientes. Se mostraron pendientes de crecimiento reducido para todas las cepas microbianas en el rango elegido. Ejemplos aquí ilustrados son *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *B. pumilus*. En el caso de *E. coli*, la pendiente de crecimiento se redujo durante aproximadamente tres horas, lo que significa que este microorganismo necesita alrededor de tres horas para resucitar [FIG. 7].

*S. aureus* mostró una pendiente reducida de crecimiento durante el periodo de tiempo de 4 horas [FIG. 8].

La levadura *C. albicans* mostro una tensión que duró incluso más. La pendiente de cultivo estuvo reducida durante más de ocho horas, durante la noche el cultivo estresado recuperó la pendiente normal de crecimiento [FIG. 9].

Para bacterias esporulantes gram-positivas la tensión con calor no es factible. Ya que los otros factores de tensión, luz UV y dilución en un producto medicamento parenteral no mostraron efectos de tensión en los microorganismos, tuvo que encontrarse otra tensión para las bacterias esporulantes. Para *bacilli* y *clostridia* se evocó un mayor contenido de esporas en la suspensión bacteriana y se realizó una medición OD [ FIG. 10]. Esta esporulación se consiguió mediante reducción de nutrientes y almacenando un cultivo microbiana grande a 2-8 °C durante más de 6 días.

Todos los microorganismos se analizaron de la manera descrita. Solamente se observaron dificultades en tres casos. Los mohos *Penicillium* y *Aspergillus* crecieron como micelio en medio líquido, por lo que no fue posible medición OD exacta. Como hay datos disponibles para *C. albicans* y para todos los microorganismos analizados, solamente se puede asumir que *Penicillium* y *Aspergillus* se comportan de la misma manera. Por lo tanto, se tomaron los parámetros analizados para la evaluación del medio de cultivo. En el otro caos, para *Propionibacterium acnes* (esta cepa crece mejor en MTF) los parámetros para una reducción de 50%, que se determinaron mediante conteo de placas, no pudieron reproducirse en el experimento de medición OD. Solamente se observó un retraso en crecimiento cuando la tensión se omitió durante un periodo prolongado de tiempo en comparación con los parámetros del experimento con reducción de  $\leq 50\%$ . *P. acnes* posiblemente mostró resultados diferentes en la medición OD debido a una mayor tensión de oxígeno. Para medición OD, se tomaron alícuotas cada hora, llevando a una cierta tensión de oxígeno para *P. acnes*. Los datos resultantes del estudio del factor de tensión se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Levaduras/Mohos	Bacterias esporulantes gram-positivas	Bacterias gram-negativas	Cocos gram-positivos	Bacilos gram-positivos
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 sin medición OD posible; 60 °C, 3 min.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 inanición (6 d)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 60 °C, 3 min.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 60 °C, 4 min.	<i>Propionibacterium acnes</i> HK-WST 60 °C, 1 min; no reproducible en medición OD.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 60 °C, 2 min.	<i>B. licheniformis</i> HK-WST (2006) inanición (6 d)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 60 °C, 2 min.	<i>Kocuria spez.</i> HK-WST 60 °C, 2 min.	<i>C. afermentans</i> HK-WST 60 °C, 2 min.
<i>Penicilium spez.</i> HK-WST sin medición OD posible; 50 °C, 3 min.	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437 inanición (15 d)	<i>Acinetobacter Lwoffii</i> HK-WST (2005) 60 °C, 2 min.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> HK-WST 60 °C, 2 min.	
	<i>Bacillus clausii</i> HK-WST (7 d)	<i>Moraxela osloensis</i> HK-WST 60 °C, 3 min.	<i>Staphylococcus warneri</i> HK-WST 60 °C, 3 min.	
	<i>Bacillus pumilus</i> HK-WST inanición (7 d)		<i>S. capitis</i> HK-WST 60 °C, 4 min.	
	<i>Bacillus sphaericus</i> HK-WST inanición (21 d)		<i>Micrococcus luteus</i> HK-WST 70 °C, 3 min.	
	<i>Bacillus idriensis</i> HK-WST inanición (7 d)			

Los parámetros de tensión y la reducción de nutrientes, por lo tanto, se usaron en la evaluación del medio de cultivo. Los factores de tensión elegidos se parecen a la tensión posiblemente presente en el proceso de producción de productos medicamentos estériles.

B. Estudio de promoción de crecimiento

Los medios de cultivo a analizar se inocularon con los microorganismos (estado estresado y no estresado) con una cantidad aproximada de 10-100 UFC. El experimento se realizó usando 5 réplicas para cada parámetro de

incubación (los parámetros de incubación son: 20-25 °C y 30-35 °C incubación aeróbica 30-35 °C incubación anaeróbica). Los resultados se contaron visualmente después de 2-7 días de incubación. Los datos sin procesar resultantes se agruparon en 6 grupos para cada microorganismo:

- 5 1. 20-25 °C incubación aeróbica – microorganismo estresado,  
 2. 20-25 °C incubación aeróbica – microorganismo no estresado,  
 3. 30-35 °C incubación aeróbica – microorganismo estresado,  
 4. 30-35 °C incubación aeróbica – microorganismo no estresado,  
 5. 30-35 °C incubación anaeróbica – microorganismo estresado,  
 10 6. 30-35 °C incubación anaeróbica – microorganismo no estresado.  
 Los medios nutrientes analizados se agruparon en subgrupos.

Lista de medios sólidos nutrientes para pre-selección (prueba de promoción de crecimiento con 10 cepas, no estresadas)

- 15
- MTF-A (Medio tioglicolato fluido que contiene 10g/L agar adicional, lo que lleva a una concentración final de 1,075% Agar), Amimed, Allschwil, Suiza.
  - ICC (Agar de infusión cerebro corazón), irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - Agar anaeróbico Brewer Difco, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania

20

  - Agar R2A, Oxoid, Gran Bretaña
  - Agar de sangre de Schaedler, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - ICR caso-agar (agar de soja tréptico), irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - Agar Columbia 5% sangre, BioMerieux, Francia

25

  - Agar de sangre anaeróbico CDC, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania

Lista de medios sólidos nutrientes para estudio final (prueba de promoción de crecimiento con 22 cepas, estado estresado y no estresado)

- 30
- Agar anaeróbico Brewer Difco, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - Agar de sangre de Schaedler, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - ICR caso-agar (agar de soja tréptico), irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania
  - Agar de sangre anaeróbico CDC, irradiado con  $\gamma$ , heipha, Eppelheim, Alemania

35 Todos los medios irradiados con  $\gamma$  se complementaron en consecuencia para mantener el proceso de radiación.

Evaluación de medio nutriente

40 El estudio de evaluación de medio nutriente se hizo en dos partes: la primera pre-selección (prueba de promoción de crecimiento con 10 cepas, no estresadas, pruebas en los ocho agares) llevó a una reducción a cuatro medios, lo que significó que solamente estos medios se tomaron en verdadera consideración. Agar MTF-A, agar de infusión cerebro corazón, agar R2A y agar Columbia 5% sangre se excluyeron en esta preselección.

45 En la evaluación del medio nutriente se analizaron los siguientes cuatro medios con detalle: agar de soja tréptico, agar de sangre anaeróbico CDC, Agar de sangre de Schaedler y agar anaeróbico Brewer Difco. Los datos resultantes, para cada una de las 22 cepas que se inocularon en un estado estresado y no estresado, se agruparon y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA. Los tres parámetros de incubación, 20-25° C y 30-35° C incubación aeróbica y 30-35 °C incubación anaeróbica y los dos diferentes estados de tensión para cada microorganismo (estresado y no estresado) llevaron a la formación de 6 grupos para cada microorganismo (multiplicado por 22 cepas). Se realizó un ANOVA de cada uno de estos grupos, se resumieron los créditos para propiedades que promovían un buen crecimiento para los 22 microorganismos para cada agar. Se dio un crédito al grupo/agar si conseguía el mayor recuento. Los grupos/agar sin diferencia significativa con este conteo más alto también consiguieron un crédito.

50

55 En la incubación de 20-25 °C aeróbica el grupo de agar de sangre de Schaedler reunió 30 créditos, el agar de sangre CDC anaeróbico 27 créditos, el agar de soja tréptico reunió 24 y agar de Brewer Difco anaeróbico 17 [Tabla 3A y 3B]. *P. acnes* y *Cl. Sporogenes* no reunieron créditos, ya que no crecen aerobíamente. *A. niger*, *B. pumilis*, *B. sphaericus* y *B. idriensis* estresadas consiguieron 0 créditos debido a los bajos recuentos en todos los agares analizados (0-5 UFC).

60

Tabla 3A: Recuento total de créditos para los microorganismos no estresados cultivados a 20-25 °C aeróbicamente.

65

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
5	<i>A. niger</i>	1	1	1
	<i>C. albicans</i>	1	1	1
	<i>B. subtilis</i>	1	1	1
10	<i>E. coli</i>	1	0	1
	<i>S. aureus</i>	1	1	1
	<i>P. aeruginosa</i>	0	1	1
	<i>A. Iwoffii</i>	1	1	0
15	<i>B. liceniformis</i>	1	1	0
	<i>M. luteus</i>	0	1	0
	<i>Cl. sporogenes</i>	0	0	0
20	<i>P. acnes</i>	0	0	0
	<i>B. clausii</i>	1	1	0
	<i>C. afermentans</i>	1	1	0
25	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1
	<i>Kocuria spez.</i>	0	0	1
	<i>Penicillium spez.</i>	0	1	0
30	<i>S. warneri</i>	0	1	0
	<i>B. pumilus</i>	1	1	1
	<i>S. capitis</i>	0	0	0
35	<i>B. sphaericus</i>	1	0	0
	<i>B. idriensis</i>	1	1	0
	<i>M. osloensis</i>	1	1	0
40	<i>total</i>	14	15	17

Tabla 3B: Recuento total de créditos para los microorganismos estresados cultivados a 20-25 °C aeróbicamente.

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
45	<i>A. niger</i>	0	0	0
	<i>C. albicans</i>	0	0	1
50	<i>B. subtilis</i>	1	1	1
	<i>E. coli</i>	0	1	1
55	<i>S. aureus</i>	1	1	0
	<i>P. aeruginosa</i>	0	1	1
	<i>A. Iwoffii</i>	1	0	0
60	<i>B. liceniformis</i>	1	1	1
	<i>M. luteus</i>	1	1	0

65

(continuación)

5	<i>A. Iwoffii</i>	1	0	0	1
	<i>B. liceniformis</i>	1	1	1	1
	<i>M. luteus</i>	1	1	1	0
10	<i>Cl. sporogenes</i>	0	0	0	0
	<i>P. acnes</i>	0	0	0	0
	<i>B. clausii</i>	1	1	1	0
	<i>C. afermentans</i>	1	0	0	0
15	<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	0
	<i>Kocuria spez.</i>	1	1	1	1
	<i>Penicillium spez.</i>	1	1	1	1
20	<i>S. warneri</i>	0	1	1	0
	<i>B. pumilus</i>	0	0	0	0
	<i>S. capitis</i>	0	1	1	0
25	<i>B. sphaericus</i>	0	0	0	0
	<i>B. idriensis</i>	0	0	0	0
	<i>M. osloensis</i>	1	1	0	1
30	<i>total</i>	10	12	13	8

En la incubación de 30-35 °C aeróbica el grupo de agar de sangre de Schaedler reunió 28 créditos, el agar de soja tríptico reunió 28 créditos, el agar de sangre CDC anaeróbico 27, y agar de Brewer Difco anaeróbico 24 [Tabla 4A y 4B]. *P. acnes* y *Cl. Sporogenes* no reunieron créditos, ya que no crecen aerobicamente. *B. idriensis* y *M. osloensis* estresadas consiguieron 0 créditos debido a los bajos recuentos (0-5 UFC).

Tabla 4A: Recuento total de créditos para los microorganismos estresados cultivados a 30-35 °C.

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
45	<i>A. niger</i>	1	1	1
	<i>C. albicans</i>	1	1	1
	<i>B. subtilis</i>	1	1	1
50	<i>E. coli</i>	1	0	1
	<i>S. aureus</i>	1	1	1
	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	1
55	<i>A. Iwoffii</i>	1	0	1
	<i>B. liceniformis</i>	1	1	1
	<i>M. luteus</i>	0	1	1
60	<i>Cl. sporogenes</i>	0	0	0
	<i>P. acnes</i>	0	0	0
	<i>B. clausii</i>	1	0	0

65

(continuación)

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
5	<i>C. afermentans</i>	1	1	1
	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1
10	<i>Kocuria spez.</i>	1	1	1
	<i>Penicillium spez.</i>	0	1	1
	<i>S. warneri</i>	1	0	1
15	<i>B. pumilus</i>	0	1	1
	<i>S. capitis</i>	0	0	1
	<i>B. sphaericus</i>	0	0	1
20	<i>B. idriensis</i>	1	0	0
	<i>M. osloensis</i>	1	1	0
	<i>total</i>	15	13	13

25

Tabla 4B: Recuento total de créditos para los microorganismos no estresados cultivados a 30-35 °C.

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
30	<i>A. niger</i>	1	1	1
	<i>C. albicans</i>	0	0	1
35	<i>B. subtilis</i>	1	1	1
	<i>E. coli</i>	1	1	1
	<i>S. aureus</i>	1	1	1
40	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	1
	<i>A. lwoffii</i>	1	1	0
	<i>B. liceniformis</i>	0	0	0
45	<i>M. luteus</i>	0	1	1
	<i>Cl. sporogenes</i>	0	0	0
	<i>P. acnes</i>	0	0	0
50	<i>B. clausii</i>	1	0	1
	<i>C. afermentans</i>	0	1	1
	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1
	<i>Kocuria spez.</i>	1	1	1
55	<i>Penicillium spez.</i>	0	1	0
	<i>S. warneri</i>	1	0	1
	<i>B. pumilus</i>	1	1	1
	<i>S. capitis</i>	0	1	1
60	<i>B. sphaericus</i>	1	1	1
	<i>B. idriensis</i>	0	0	0
	<i>M. osloensis</i>	1	0	0
65	<i>total</i>	13	14	15

ES 2 540 544 T3

En la incubación de 30-35 °C anaeróbica el grupo de agar de sangre CDC anaeróbico reunió 25 créditos, el agar de sangre de Schaedler 25 créditos, el agar de soja tríptico 21 y el agar de Brewer Difco anaeróbico 17 créditos [Tabla 5A y 5B]. *P. acnes* y *Cl. Sporogenes* no reunieron créditos, ya que no crecen aeróbicamente. *B. idriensis* estresada consiguió 0 créditos debido a los bajos recuentos (0-5 UFC).

5

Tabla 5A: Recuento total de créditos para los microorganismos no estresados cultivados a 30-35 °C anaeróbicamente. No todos los microorganismos crecieron anaeróbicamente, por lo que no se dio recuento.

10

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
<i>A. niger</i>	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	0	1
<i>B. subtilis</i>	1	1	1	1
<i>E. coli</i>	1	1	1	1
<i>S. aureus</i>	1	1	0	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	1	1	1
<i>A. lwoffii</i>	0	0	0	0
<i>B. liceniformis</i>	1	1	1	0
<i>M. luteus</i>	0	0	0	0
<i>Cl. sporogenes</i>	1	1	1	0
<i>P. acnes</i>	1	1	1	0
<i>B. clausii</i>	1	0	0	0
<i>C. afermentans</i>	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	1
<i>Kocuria spez.</i>	1	1	1	1
<i>Penicillium spez.</i>	0	0	0	0
<i>S. warneri</i>	1	1	1	1
<i>B. pumilus</i>	0	1	0	1
<i>S. capitis</i>	0	0	0	1
<i>B. sphaericus</i>	1	1	1	1
<i>B. idriensis</i>	1	1	1	0
<i>M. osloensis</i>	0	0	0	0
<i>total</i>	13	13	11	11

45

Tabla 5B: Recuento total de créditos para los microorganismos estresados cultivados a 30-35 °C anaeróbicamente. No todos los microorganismos crecieron anaeróbicamente, por lo que no se dio recuento.

50

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
<i>A. niger</i>	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	1	0
<i>B. subtilis</i>	1	1	1	1
<i>E. coli</i>	1	1	1	1
<i>S. aureus</i>	1	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	0	1	1	1
<i>A. lwoffii</i>	0	0	0	0

65

(continuación)

	TSA	CDC	Schaedler	Brewer
5	<i>B. liceniformis</i>	1	1	1
	<i>M. luteus</i>	0	0	0
	<i>Cl. sporogenes</i>	0	1	0
10	<i>P. acnes</i>	1	1	0
	<i>B. clausii</i>	1	0	0
	<i>C. afermentans</i>	0	0	0
15	<i>S. epidermidis</i>	0	1	0
	<i>Kocuria spez.</i>	0	0	0
	<i>Penicillium spez.</i>	0	0	0
	<i>S. wameri</i>	0	1	0
20	<i>B. pumilus</i>	1	1	1
	<i>S. capitis</i>	0	1	0
	<i>B. sphaericus</i>	1	1	0
	<i>B. idriensis</i>	0	0	0
25	<i>M. osloensis</i>	0	0	0
	<i>total</i>	8	12	6

Los datos mostraron que agar de sangre de Schaedler tuvo las mejores propiedades que promovían el crecimiento para las condiciones aeróbicas, en la condición anaeróbica consiguió la misma cantidad de créditos que agar de sangre CDC anaeróbico. Por lo tanto, el agar de sangre de Schaedler se seleccionó como el agar adecuado para las 22 cepas analizadas y para los tres parámetros de incubación analizados. La composición de agar de sangre Schaedler (13) (modificada por heipha, Eppelheim, Alemania) es de la siguiente manera: peptona de caseína 10g, peptona de harina de soja 1g, peptona de carne 1g, carne exacta 1g, extracto de levadura 5g, glucosa 2g, NaCl 5g, fosfato de hidrógeno dipotasio 2,5g, agar grado bacteriológico 14g, sangre de oveja 50ml, aminoácidos, hemina, vitamina K, irradiado con gamma: 9-29kGy.

Diferencias entre incubación aeróbica a 20-25 °C y a 30-35 °C

Se realizó una prueba t usando los datos de la evaluación de medios nutrientes para mostrar si hay una diferencia significativa entre las temperaturas de incubación 20-25 °C y 30-35 °C (incubación aeróbica).

La prueba t se realizó en 40 grupos consistentes en todos los microorganismos aerobicos (sin *Cl. Sporogeloes* y *P. acnes*) en estado estresado y no estresado. En 11 grupos de los 40 grupos ocurrió una diferencia significativa. El parámetro de incubación de 30-35 °C mostró 5 veces cantidades mayores de unidades formadoras de colonias (procedentes del mismo inóculo) en comparación con el grupo de 20-25 °C. El grupo de 20-25 °C produjo mayores valores en los seis casos. La prueba t mostró que hay una diferencia significativa entre las temperaturas. Como la diferencia fue significativa en 11 de 40 casos es necesario validar ambas temperaturas de incubación en la prueba rápida de esterilidad. Estos resultados enfatizan la importancia de ambas temperaturas de incubación no solamente para la prueba tradicional de esterilidad sino también para la prueba rápida de esterilidad.

Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de datos se usó el siguiente método implementado en el software estadístico Minitab® Release 14.20.

El ANOVA (Análisis de varianza) compara medias. Un ANOVA es similar a un análisis de regresión, porque se usa para investigar y modelar la relación entre una variable de respuesta y una o más variables independientes (entre grupos). Usa pruebas de hipótesis, esto significa que se prueba una hipótesis nula. El ANOVA da como resultado un valor p. El valor p representa la probabilidad de hacer un error de Tipo 1, o rechazando la hipótesis nula cuando es verdad. El valor límite es 0,05 – la hipótesis nula se rechaza, cuando el valor p está por debajo de 0,05 lo que corresponde a un límite de confianza de 95%.

Los pre-requisitos para usar un análisis ANOVA son:  
 - distribución normal de los cuatro serogrupos (el medio nutriente), valor  $p \geq 0,05$   
 - analizar varianzas iguales usando Prueba de Bartlett: valor  $p \geq 0,05$  y



- Prueba de Levene: valor  $p \geq 0,05$

5 El valor  $p$  de ANOVA  $\geq 0,05$  significa que no hay una diferencia significativa entre los subgrupos los agares, el valor  $p < 0,05$  una diferencia significativa entre subgrupos/agares. Cada agar que mostró ninguna diferencia significativa con el valor medio más alto (incluyendo el que tiene la media más alta) se clasificó con un crédito. Un agar que mostró una diferencia significativa con el valor medio más alto no consiguió ningún crédito. El análisis de valor atípico se realizó usando la Prueba de Dixon (W. J. Dixon, Ann. Math. Statist., 21:488-506 (1950); W. J. Dixon, Biometrics, 9:74-89 (1953); USP <1010> "Interpretación y tratamiento de datos analíticos", Foro Farmacopeico. USP-NF en el segundo suplemento "The United States Pharmacopeial Convention, Inc.). Para esto, los valores  $N$  que comprenden el conjunto de observaciones bajo examen se dispusieron en orden ascendente:  $X_1 < X_2 < \dots < X_N$ . Después, se calculó el valor  $Q$  experimental estadístico ( $Q_{exp}$ ). Esto es una proporción definida como la diferencia del valor sospechoso con su valor más cercano dividido entre el rango de los valores ( $Q$ : cociente de rechazo). Así, para analizar  $X_1$  o  $X_N$  (como posibles valores atípicos) se usaron los siguientes valores  $Q_{exp}$ :

15 El valor  $Q_{exp}$  obtenido se comparó con un valor  $Q$  crítico ( $Q_{crit}$ ) encontrado en las tablas. Si  $Q_{exp} > Q_{crit}$ , entonces el valor sospechoso puede caracterizarse como un valor atípico y puede rechazarse. Si no es así, el valor sospechoso tendrá que mantenerse y usarse en todos los cálculos posteriores. Otros métodos capaces de realizar ANOVA fueron los siguientes: Los subgrupos (los cuatro medios nutrientes dentro de un grupo) que no siguieron la distribución normal y fueron significativamente inferiores a los otros subgrupos se excluyeron, porque fueron irrelevantes para ANOVA. Si los valores de UFC el subgrupo dentro de un grupo eran demasiado bajos (0-5 UFC), se dio el resultado final de 4 veces 0 créditos. En el resto de los casos tuvo que repetirse la prueba. Se usó una prueba  $t$  (también usando el software estadístico Minitab® Release 14.20) para comparar medias de dos muestras; la prueba  $t$  compara la diferencia real entre dos medias en relación con la variación en datos (expresada como la desviación estándar de la diferencia entre las medias).

#### C. Descripción general del sistema de detección de microbiología rápida Milliflex®

30 Las muestras bajo prueba (diluidas en 100 ml de fluido de enjuague para asegurar una distribución adecuada de microorganismos en la membrana) se filtrarán en un filtro rápido Milliflex® usando una bomba PUMP Milliflex®, una posible contaminación quedará atrapada en la membrana de filtro (tamaño de poro: 0,45  $\mu\text{m}$ ).

35 Después de la filtración el filtro se aplicará a medio sólido nutriente usando el sistema Milliflex®, en el que el filtro estéril Milliflex® pulsa el casete Milliflex® y el embudo se parte. Debido a este sistema Milliflex® para transferir la membrana al medio nutriente, habrá menor o ningún riesgo de contaminación secundaria mediante la manipulación de la membrana. Como los casetes están cerrados herméticamente, el riesgo de contaminación secundaria durante la incubación es bajo. Al incubar los filtros en los casetes Milliflex®, puede tener lugar el crecimiento de contaminantes potenciales en las micro-colonias. Al finalizar el tiempo de de incubación, los filtros se separarán de los casetes Milliflex® y se aplicarán a la estación de auto-pulverización dentro de un extractor laminar de flujo. Las etapas después de la incubación críticas en lo que se refiere a contaminación secundaria, ya que las micro-colonias tienen un cierto tamaño (aproximadamente: 10-100 células de levadura, 1000 células bacterianas) para su detección en el rápido Milliflex®. Si un microorganismo medioambiental o derivado del operario se añade a la membrana durante las etapas después de la incubación, no se detectará debido a la falta de incubación y por lo tanto la falta de una cierta cantidad de ATP que es necesario para su detección.

45 La estación de auto-pulverización pulveriza el agente que libera ATP y después el reactivo de bioluminiscencia en la membrana.

50 La química de reacción aquí mostrada es la base de la detección rápida Milliflex® (W. D. McElroy, Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol., 25:119-166 (1963)):

Luciferina + ATP  $\xrightarrow{\text{Luciferasa, Mg}^{2+}}$  Oxiluciferina + AMP + hv ( $\lambda = 562\text{nm}$ ) (Mg<sup>2+</sup> significa Magnesio, ATP adenosín trifosfato, AMP adenosín monofosfato, hv fotón emitido,  $\lambda$  longitud de onda)

55 Es necesaria la transferencia rápida de la membrana pulverizada de la estación de auto-pulverización a la torre de detección rápida Milliflex® con el fin de coger el máximo de fotones emitidos. Las posibles señales de luz se detectan con una cámara CCD (dispositivo acoplado cargado) y el algoritmo del software rápido Milliflex® calcula la cantidad de micro-colonias.

#### Sin fondo luminiscente en la detección rápida Milliflex®

60 Como se usará agar de sangre de Schaedler en el sistema de microbiología rápida Milliflex®, se realizó una prueba para determinar si este medio provoca fondo luminiscente. Para esto, se incubaron casetes de medio con una membrana MXHVWP124 (Membrana de polivinilideno fluoruro, tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ) que se ha enjugado con 100ml de Fluido A o Fluido D. La temperatura de incubación fue 30-35 °C, incubado durante 5 días. La Figura 11

## ES 2 540 544 T3

muestra que no hay fondo de luminiscencia procedente del agar de sangre de Schaedler, lo que significa que no se deja ATP alarmante en el medio nutriente irradiado con gamma. El agar de sangre de Schaedler es adecuado para su uso en el sistema rápido Milliflex®.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

1. Un método para pruebas de esterilidad de una composición farmacéutica líquida que comprende:
- 5 (a) proporcionar una composición farmacéuticamente filtrable;  
 (b) filtrar la composición farmacéutica para proporcionar al menos tres membranas de filtro sobre las cuales se deposita el filtrado de la composición farmacéutica;  
 (c) colocar al menos las tres membranas de filtro en medios sólidos de cultivo para producir al menos tres cultivos de filtrado;
- 10 (d) cultivar (i) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C; (ii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C; y (iii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C; con la condición de que ninguno de los cultivo de filtrado se cultive durante un periodo superior a aproximadamente 13 días y
- 15 (e) detectar una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en una membrana, donde la presencia de una célula de microorganismo, micro-colonia o colonia viable en la membrana indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.
2. El método de la reivindicación 1, donde (b) además comprende filtra una solución de lavado después de que la composición farmacéutica se haya filtrado.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 ó 2 donde la(s) membrana(s) es/son una membrana de polivinilideno fluoruro, membrana de fibra de vidrio, membrana de policarbonato, membrana de tereftalato de polietileno, éteres mezclados de celulosa (acetato de celulosa y nitrato de celulosa), membrana de fosfocelulosa, membrana DEAE, membrana de red de nylon o membrana de politetrafluoroetileno.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la(s) membrana(s) tiene/tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,45 µm.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medio sólido de cultivo se selecciona del grupo consistente en MTF-A (medio tioglicolato fluido que contiene 1,075% agar (concentración final)), ICC (agar de infusión de cerebro y corazón), agar anaeróbico Brewer Difco, agar R2A, agar de sangre de Schaedler, agar-caso ICR (agar de soja trípatico), agar Columbia 5% sangre, y agar de sangre anaeróbico CDC.
- 35 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde en (d) los cultivos de filtrado se cultivan durante un periodo de tiempo suficiente para la producción de una cantidad detectable de adenosín trifosfato.
7. El método de la reivindicación 6, donde los cultivos de filtrado se cultivan durante un periodo de aproximadamente 2 a aproximadamente 7 días.
- 40 8. El método de la reivindicación 7, donde los cultivos de filtrado se cultivan durante un periodo de 5 días.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde en (e) una células de microorganismo, micro-colonia o colonia viable se detecta usando un ensayo de luminiscencia.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, donde el ensayo de luminiscencia: (i) detecta adenosín trifosfato producido por un microorganismo, micro-colonia o colonia viable en la membrana; (ii) comprende un ensayo de luciferasa; o (iii) detecta un producto de hibridización de ácido nucleico formado entre una sonda y un ácido nucleico endógeno a un microorganismo, que comprende por ejemplo una reacción de peroxidasa.
- 50 11. El método de la reivindicación 9 o 10, donde se detecta luminiscencia usando una cámara con dispositivo cargado acoplado y software de análisis de imágenes.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se realiza en un sistema de detección de microbiología rápido que comprende una estación de preparación de muestra, una estación de auto-pulverización, una torre de detección, una analizador de imágenes, una cámara CCD y un ordenador con software.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición farmacéutica es una composición parenteral, una composición oral, una composición nasal, o una composición ocular.
- 60 14. El método de la reivindicación 13, donde la composición farmacéutica es una vacuna, por ejemplo, seleccionada del grupo consistente en vacuna de ántrax; vacuna de tuberculosis; vacuna de Borreliosis; vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos; vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis; vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular; y *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado; vacuna de toxoide de difteria y toxoide de tétanos y pertussis acelular y *Haemophilus influenzae* tipo b conjugado y poliovirus inactivado; vacuna de virus de hepatitis A; vacuna de virus de hepatitis A y hepatitis B; vacuna de virus de hepatitis B; vacuna de *Helicobacter pylori*; vacuna de
- 65

5 *Haemophilus influenzae* tipo b; vacuna de virus de influenza; vacuna de poliovirus; vacuna meningocócica (*Neisseria meningitidis*); vacuna del virus de sarampión, virus de paperas, virus de rubeola; vacuna del virus de sarampión, virus de paperas, virus de rubeola y virus de varicela; vacuna neumocócica (*Streptococcus pneumoniae*); vacuna de rabia; vacuna de virus sincitial respiratorio; vacuna de viruela; vacuna de toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*); vacuna tifoidea (*Salmonella typhi*); vacuna de tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*); vacuna de varicela (varicela, virus de varicela zóster); y preferentemente donde dicha vacuna es una vacuna de gripe aviar o vacuna de gripe porcina.

10 15. Un método para pruebas de esterilidad de una composición farmacéutica líquida que comprende:

- 15 (a) proporcionar una composición farmacéuticamente filtrable;
- (b) filtrar la composición farmacéutica para proporcionar al menos tres membranas de filtro sobre las cuales se deposita el filtrado de la composición farmacéutica;
- 20 (c) colocar al menos las tres membranas de filtro en medios sólidos de cultivo para producir al menos tres cultivos de filtrado;
- (d) cultivar (i) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas a 20-25 °C; (ii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones aeróbicas de 30-35 °C; y (iii) al menos un cultivo de filtrado bajo condiciones anaeróbicas de 30-35 °C; con la condición de que ninguno de los cultivo de filtrado se cultive durante un periodo superior a aproximadamente 13 días y
- 25 (e) detectar adenosín trifosfato (ATP) en la membrana, donde la presencia de ATP en una membrana indica la presencia de un microorganismo viable en la composición farmacéutica.

25

30

35

40

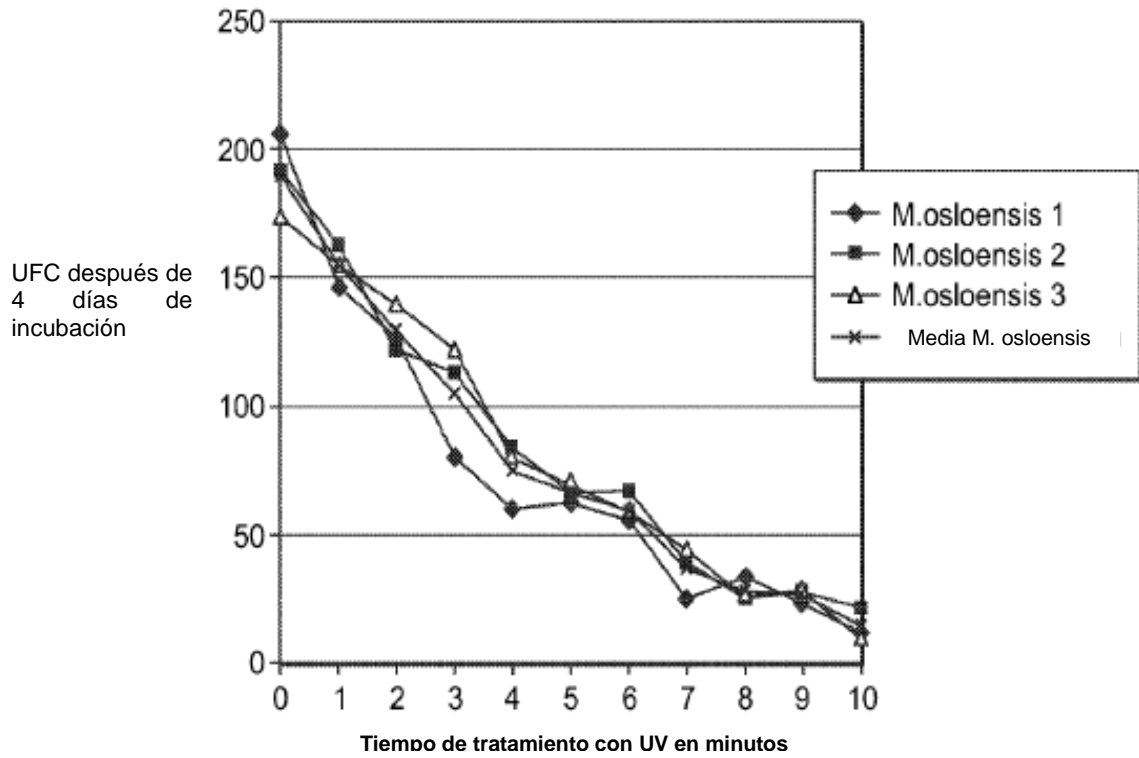
45

50

55

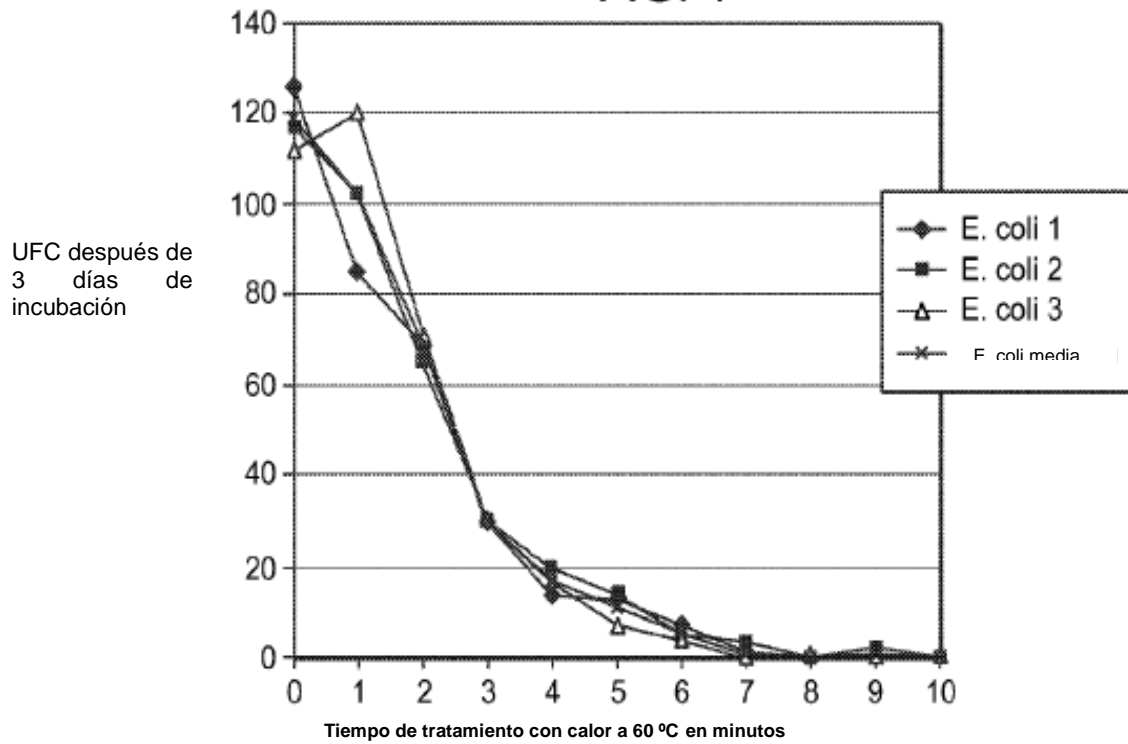
60

65



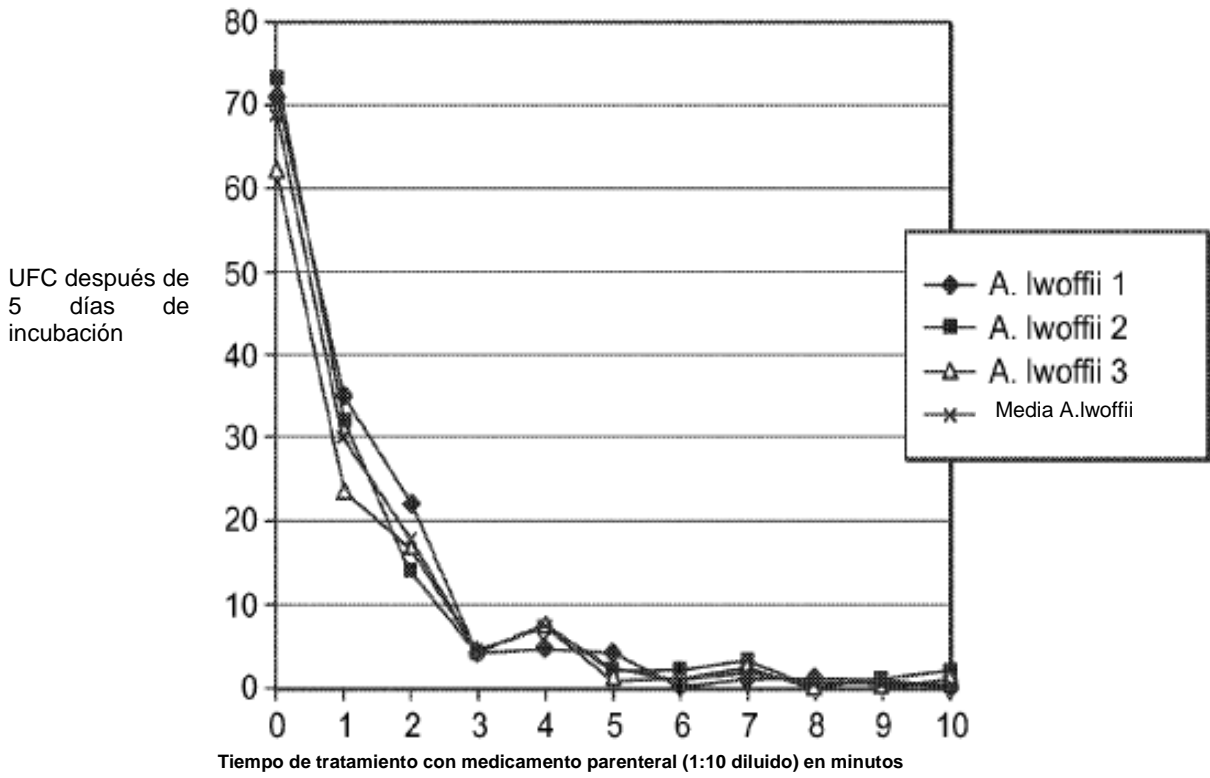
Datos de *M. osloensis* para tratamiento con UV durante un periodo de tiempo de 10 minutos, reducción de  $\geq 50\%$  después de 4 minutos (3 ciclos)

FIG. 1



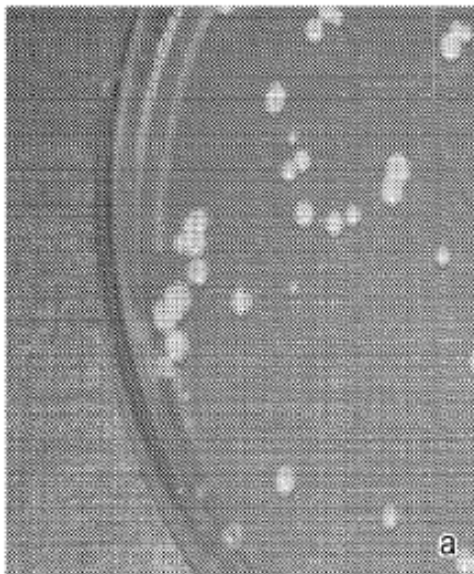
Datos de *E. coli* para tratamiento con calor a 60 °C durante un periodo de tiempo de 10 minutos, reducción de  $\geq 50\%$  después de 3 minutos (3 ciclos)

FIG. 2



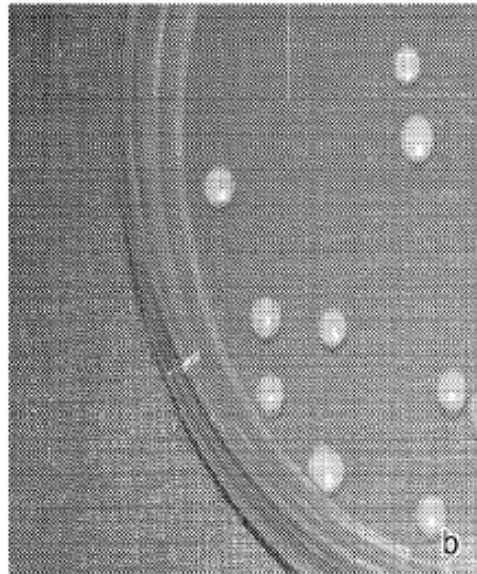
Datos de *A. lwoffii* para tratamiento con medicamento parenteral durante un periodo de tiempo de 10 minutos, reducción de  $\geq 50\%$  después de 3 minutos (3 ciclos)

FIG. 3



*M. luteus* tratado con calor (70 °C, 3 min) comparado con la FIG. 4b

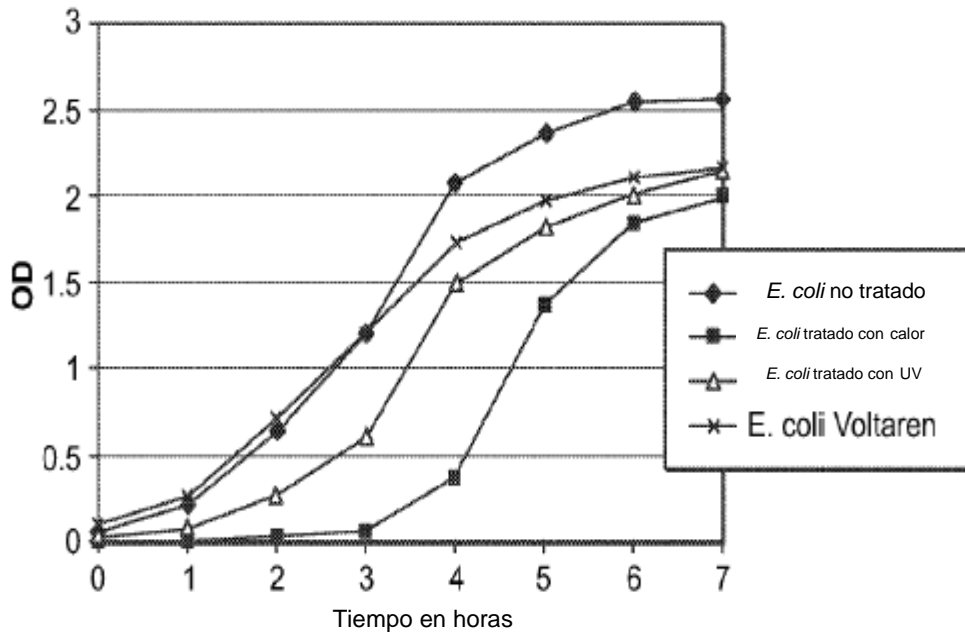
FIG. 4a



*M. luteus* no tratado colocado en placas en agar de soja trípatico, 3 días de incubación a 30-35 °C.

FIG. 4b

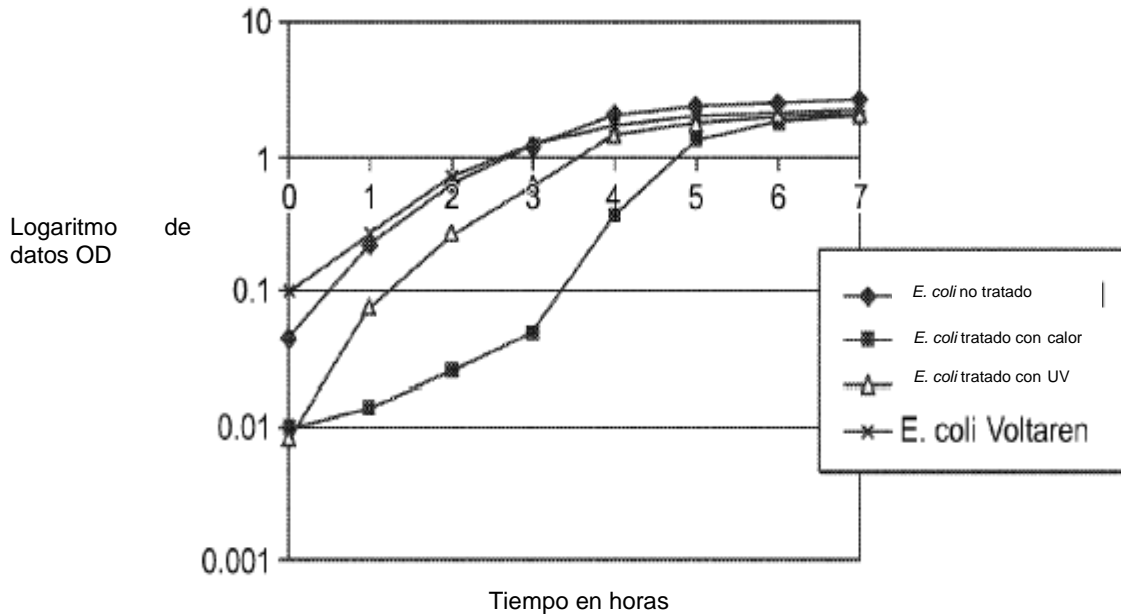
Curvas de crecimiento medición OD



Datos de densidad óptica representados para el cultivo de *E. coli* no tratado, *E. coli* tratado con calor, *E. coli* tratado con UV y *E. coli* tratado con producto medicamento parental (Voltaren).

FIG. 5

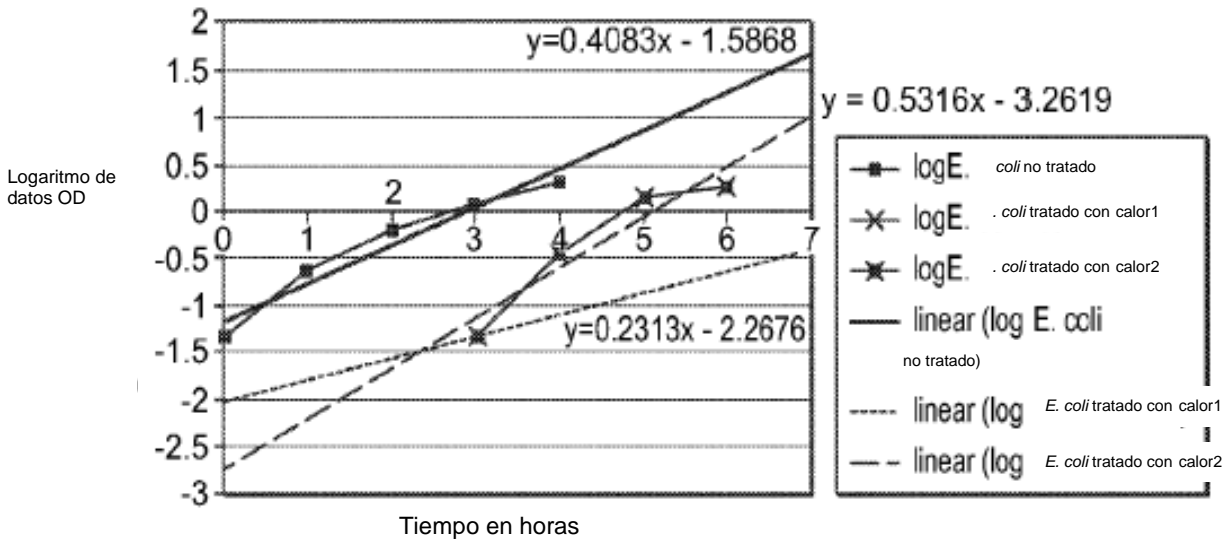
Curvas de crecimiento logarítmico



Datos de densidad óptica representados para el cultivo de *E. coli* no tratado, *E. coli* tratado con calor, *E. coli* tratado con UV y *E. coli* tratado con producto medicamento parental.

FIG. 6

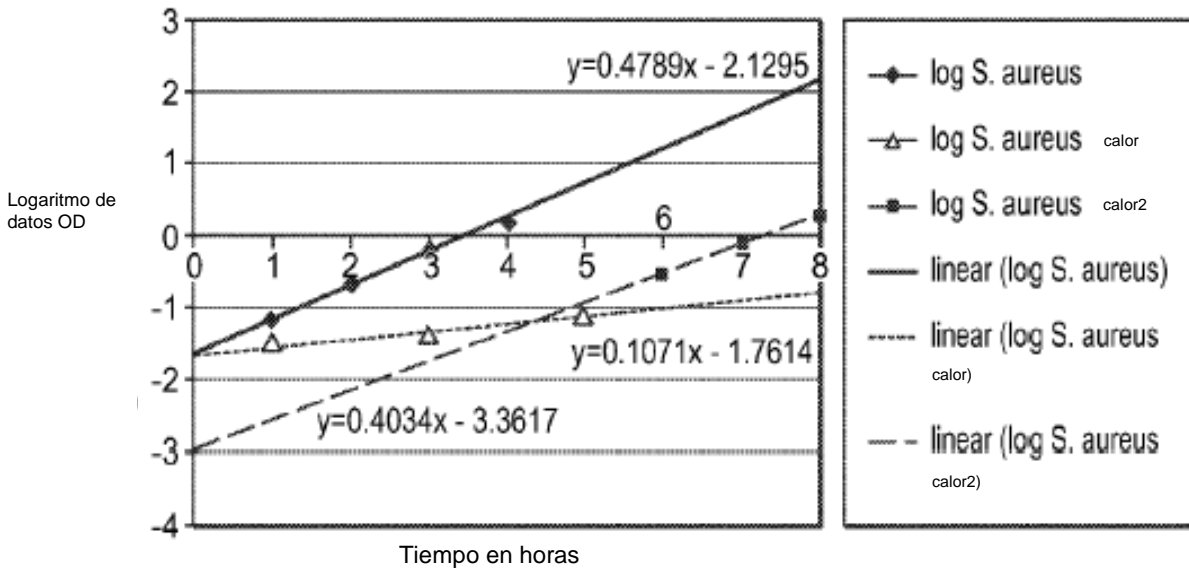
Curvas de crecimiento logarítmico



Comparación de curvas de crecimiento de *E. coli* no tratado y *E. coli* tratado con calor, durante tres horas el cultivo estresado de *E. coli* tiene una pendiente de 0,2313, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado.

FIG. 7

Curvas de crecimiento logarítmico

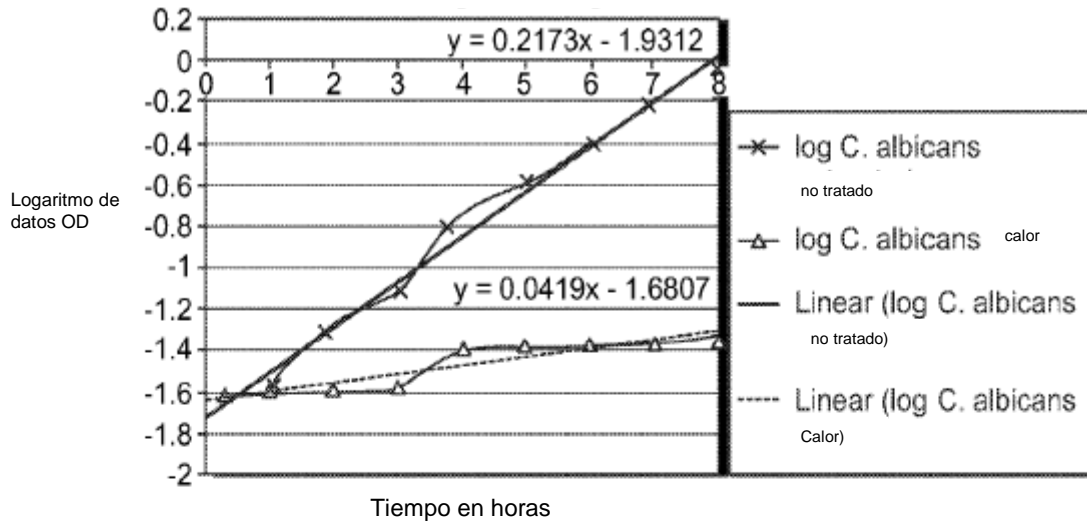


Comparación de curvas de crecimiento de *S.aureus* no tratado y *S.aureus* tratado con calor, durante cuatro horas el cultivo estresado de *S.aureus* tiene una pendiente de 0,1071, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado (después de 4 horas 0,4034).

FIG. 8



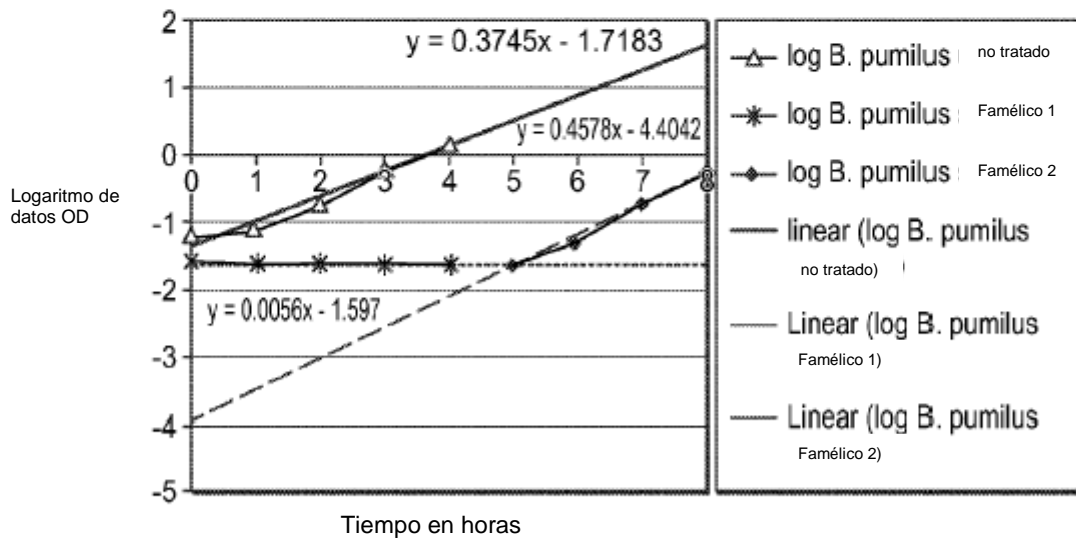
Curvas de crecimiento logarítmico



Comparación de curvas de crecimiento de *C. albicans* no tratado y *C. albicans*, durante más de ocho horas el cultivo estresado de *C. albicans* tiene una pendiente de 0,0419.

FIG. 9

Curvas de crecimiento logarítmico



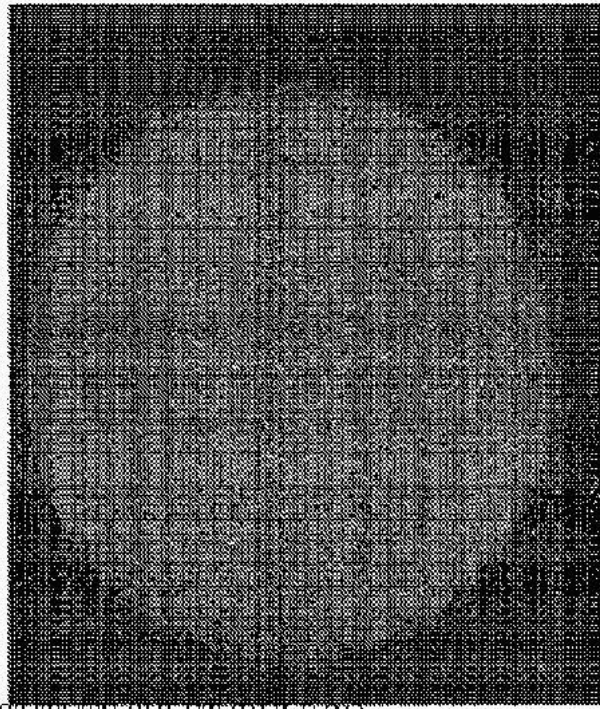
Comparación de curvas de crecimiento de *B. pumilus* no tratado (mayor porcentaje de células vegetativas, menor cantidad de esporas) y *B. pumilus* privado de nutrientes (reducción de nutrientes durante siete días a 2-8 °C; alta cantidad de esporas), durante cinco horas el cultivo estresado de *B. pumilus* tiene una pendiente de -0,0056, después vuelve a subir a la pendiente normal del cultivo no tratado.

FIG. 10

**Prueba de fondo de RSTM-Agar: membranas Milliflex Rapid MXHVWP124 se incubaron en RSTM en casetes Milliflex durante 5 días a 30-35 °C**

Millipore Milliflex Rapid (Torre SIN = 534101)  
Detalles de la muestra (fondo-fluido a-004')

Página impresa el 26 de febrero de 2008 a las 15:10:22 por grayjet (usuario supervisor)  
Imagen de muestra

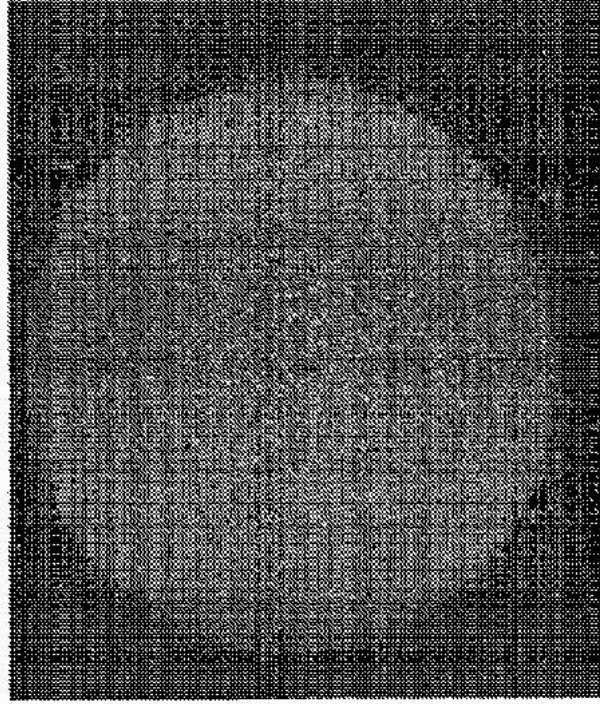


La imagen Milliflex Rapid, la membrana en este caso se enjuagó con 100mL de Fluido A.

**FIG. 11a**

Millipore Milliflex Rapid (Torre SIN = 534101)  
Detalles de la muestra (fondo-fluido a-007')

Página impresa el 26 de febrero de 2008 a las 15:10:22 por grayjet (usuario supervisor)  
Imagen de muestra



Muestra una membrana enjuagada con 100mL Fluido D.

**FIG. 11b**