

# **ANUARIO CIENTÍFICO**

**2005**

Volumen 1

*Suplemento especial del Boletín InfoCEDMED*

---

**Año 3**

**ISSN 1684-1867**

**CECMED**

Director: Dr. Jesús Saiz Sánchez  
e-mail: saiz@cecmed.sld.cu  
Teléfono: (537) 271-8645  
Fax: (537) 271-4023

Edición: Vivian Fernández Sánchez  
Diseño: Vivian Fernández Sánchez  
Composición: Pedro J. Pérez Ramírez  
Impresión: Alexander Blanca

## ***Consejo Editorial***

### **Presidente**

Dr.C. Rafael Pérez Cristiá

Director del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

### **Miembros**

Dra. Consuelo García Gea

Instituto de Farmacia "San Pablo", Barcelona, España

Dra. Irene Goncalves Goncalves

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela

Dra. Santa Deybis Orta Hernández

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

Dra. Loida Oruña Sánchez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

Dra. Diadelys Rémirez Figueredo

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

Dra. Isabel R. C. Rojas Gattorno

Centro Nacional de Biopreparados, Cuba

MSc. Arlene Rodríguez Silva

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba

Dr. Jesús Saiz Sánchez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

Dra.C. Celeste Aurora Sánchez González

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Cuba

Dra. Miriam Velásquez Navarro

Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela

## **Índice**

<i>EDITORIAL</i>	7
<b>Reseñas</b>	8
<i>BASE CIENTÍFICA DEL DESARROLLO DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE VACUNAS COMO PARTE ILUSTRATIVA DE LA EVOLUCIÓN Y LA DINÁMICA DE LA CIENCIA</i>	8
<i>MSc Mario Landys Chovel Cuervo</i>	
<i>REVISIÓN SOBRE EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF). PROPIEDADES Y MÉTODOS DE ENSAYO DE POTENCIA</i>	16
<i>Dra. Diadelis Ramirez, Lic. Natacha Reyes, Lic. Ana Lara Sterling, MSc Mario Landys Chovel</i>	
<i>MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DESINFECTANTES SOBRE LA FISIOLOGÍA BACTERIANA</i>	23
<i>Lic. María de los Ángeles Ramos García</i>	
<i>MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PREPARACIONES COMERCIALES DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE</i>	29
<i>Lic. Natacha Reyes, Dra. Diadelys Remíz</i>	
<i>CONSIDERACIONES PARA LA EJECUCIÓN DE LAS AUDITORÍAS DE LA CALIDAD EN INSTITUCIONES DE SALUD</i>	37
<i>Dr. Milo Oliver Blanco, Dr. Jesús Saiz Sánchez</i>	
<i>EVALUACIÓN ECONÓMICA DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LA INSUFICIENCIA CARDIACA EN CUBA</i>	42
<i>Lic. Manuel Collazo Herrera, Dr. David García Barreto, Dra. Damaris Hernández Véliz, Dr. Helmer Torres Díez, Dr. Ricardo Campos Muñoz, Dr. Luis R. Suárez Fleites</i>	
<b>Investigación – Desarrollo</b>	54
<i>PREVALENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN BAÑOS DE ENJUAGUES DE ENDOSCÓPIOS Y EFICIENCIA DE DESINFECTANTES DE USO HOSPITALARIO</i>	54
<i>Lic. Ma. de los Ángeles Ramos García, Dra. Dolores Martínez Portillas</i>	
<i>DELIMITACIÓN ENTRE MEDICAMENTOS Y EQUIPOS MÉDICOS EN EL SISTEMA REGULADOR SANITARIO CUBANO</i>	63
<i>Lic. Silvia Delgado Ribas; Dra. C. Celeste Aurora Sánchez González; Lic. Karina Marinonovna Alfonso Alfonso</i>	

<i>DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA CUBANO DE RETIRADA DE MEDICAMENTOS DEFECTUOSOS DEL MERCADO</i>	70
<i>Dra. C. Celeste Sánchez González, Lic. Danay Mora Pascual, Ing. Diana García García</i>	
<i>CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INSPECCIÓN FARMACÉUTICA ESTATAL EN EL CECMED</i>	78
<i>Lic. Grethel Ortega Larrea, MSc. Mireya Coimbra Reyes, Lic. Jorge Ricardo Martínez Machín</i>	
<i>IMPLEMENTACIÓN DE LOS ENSAYOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS SUMINISTROS QUE SE UTILIZAN EN EL LABORATORIO NACIONAL DEL CECMED</i>	91
<i>Tec. Mabel García, MSc. Ivette Abreu, Lic. Ana Lara, Lic. Ania Fernández, Lic. Natacha Reyes, Dra. Diadelis Remírez,, MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Lic. Zoila González</i>	
<i>PERFECCIONAMIENTO DE LAS LISTAS DE CHEQUEO PARA LA LIBERACIÓN DE LOTES DE VACUNAS</i>	99
<i>Lic. Erick Duque Gil, Lic. Danay Mora Pascual, Lic. Juliette Escoto López, Lic. Yasmiani Pérez, Lic. Yanet Hechevarría Núñez, Lic. Ivón Pauste Cedeño</i>	
<i>ASPECTOS ÉTICOS EN LOS ESTUDIOS CLÍNICOS CON LA NUEVA VACUNA SINTÉTICA CUBANA CONTRA EL Haemophilus influenzae TIPO b, Quimi-Hib</i>	105
<i>MSc. Arlene Rodríguez Silva, Dra. María Eugenia Toledo Romani, Dra. Verena Muzio González, Dr. Aristides Aguilar Betancourt, Dra. Raydel Martínez Sánchez, Dra. Violeta Fernández Santana, Lic. Alberto Baly Gil, Dra. Santa Deybis Orta Hernández, Dr. Eugenio Hardy Rando, Dr. Vicente Vérez Bencomo</i>	
<b><i>Trabajo Experimental</i></b>	117
<i>EVALUATION OF RESULTS DERIVED FROM THE IMPLEMENTATION OF A QUALITY ASSURANCE PROGRAM IN THE NATIONAL CONTROL LABORATORY OF CUBA</i>	117
<i>MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Lic. Ana Lara Sterling, MSc. Ivette Abreu Nicot, Lic. Natacha Reyes Huerta, Lic. Ania Fernández de Castro Yanes, Téc. Mabel García Rodríguez</i>	

<i>ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOGENICIDAD DE VACUNAS CONTRA HAEMOPHILUS INFLUENZAE TIPO B (HIB) EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE LA CALIDAD</i>	126
<i>MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Dr. Juan Miguel Figueroa Medina, Lic.. Lidia Rosa Pérez Villavicencio, Téc. Vicente Perdomo Llamo</i>	
<i>EVALUACIÓN DE LOTES DE VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA ORAL DE IMPORTACIÓN MEDIANTE LOS ENSAYOS DE POTENCIA, IDENTIDAD Y TERMOESTABILIDAD</i>	138
<i>MSc. Ivette Abreu, Tec. Mabel García, Lic. Ana Lara, Lic. Ania Fernández, MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Lic. Natacha Reyes, Dra. Diadelys Remírez</i>	
<i>EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE FILTRACIÓN POR MEMBRANAS Y PLACA VERTIDA EN EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS PURIFICADAS EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE LA CALIDAD</i>	146
<i>Lic. Adamelis Rosario Avilés Boza, Lic. Raisi Morales Valdés, Lic. Maria de los Angeles Ramos García</i>	
<i>DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA EN EL UNGÜENTO Q.L</i>	156
<i>Lic. Danay Angélica Díaz Sutherland, Lic. Maité Elisa Oviedo Gálvez, Téc. Ana Irma Rodríguez</i>	
<b><i>Tesis de Grado</i></b>	167
<i>CONTROL DE LA DOCUMENTACIÓN EN LA AUTORIDAD NACIONAL DE CONTROL DE MEDICAMENTOS</i>	167
<i>Lic. Gretel Frias Ferreiro, MSc. Ana Mayra Ysa Sánchez</i>	
<b><i>Informativas</i></b>	178
<i>ACTIVIDAD ACADÉMICA</i>	178
<i>CÓMO PUBLICAR</i>	184

## ***Editorial***

Presentamos a continuación la tercera edición del Anuario Científico, órgano oficial del Consejo Científico de la Autoridad Reguladora Nacional de Medicamentos, CECMED, de la República de Cuba. El Anuario representa una publicación periódica y una contribución a la divulgación de los resultados científicos y técnicos del Centro, en el cumplimiento de su misión de vigilancia y protección de la salud pública, a través de un sistema regulador de medicamentos y diagnosticadores, capaz de garantizar el acceso a la población de productos con calidad, seguridad y eficacia.

Dentro de su contenido se mantiene la inclusión de reseñas relativas a reglamentación farmacéutica, trabajos de investigación y desarrollo, el resultado de trabajos experimentales y los resúmenes de tesis para optar por grados científicos, entre otros temas. Aprovechamos la ocasión para invitar a profesionales nacionales y de otros países a colaborar en la próxima edición mediante la presentación de trabajos de acuerdo a las indicaciones del epígrafe “Cómo publicar” en este órgano.

El año transcurrido estuvo matizado de importantes resultados para el fortalecimiento de la Reglamentación Farmacéutica de nuestro país. Por su trascendencia, nos referiremos a los más importantes.

La celebración de la Primera Conferencia Nacional de Reglamentación Farmacéutica y el Primer Taller de Regulación Sanitaria de Diagnosticadores, eventos que permitieron realizar una valoración del estado del arte internacional y nacional de la actividad, de las características de su implementación y la necesidad de su permanente actualización e implementación en función de las necesidades del país.

Estos eventos, que contaron con la participación de las entidades reguladas, también propiciaron, sin lugar a dudas, la promoción de la transparencia y la comunicación en el accionar del CECMED, la definición de roles y la mutua retroalimentación entre la autoridad y las instituciones a las cuales debemos ofrecer nuestros servicios.

En la evaluación realizada a finales del pasado año, los resultados de los cambios realizados en la estructura del Centro en el año 2000, ejecutados en función de dar respuesta a los adelantos alcanzados por la industria biotecnológica en Cuba, fueron catalogados de satisfactorios; según quedó demostrado en los resultados positivos obtenidos en las evaluaciones de nuestro desempeño realizadas por la OMS, tanto para el área de vacunas, 2000 y 2003, como para el área de medicamentos, 2004. Esta última recomendó con acertada visión de futuro, que, una vez alcanzados estos resultados, debíamos estudiar un nuevo ajuste de la estructura del Centro en función de las seis funciones básicas de una autoridad reguladora de medicamentos, en aras de estar a la altura de los nuevos retos internacionales de funcionalidad, uniformidad, integración y competencia de la actividad reguladora.

El próximo año traerá consigo el necesario salto de calidad que requiere el perfeccionamiento del CECMED en aras de incrementar su rol nacional e internacional, a lo cual esta publicación no estará ajena. Por todo ello, no sólo esperamos que este número contribuya al desarrollo de la comunicación científica, sino que podamos hacer realidad el compromiso de elevar a planos superiores el desempeño de nuestra autoridad con rigor científico y administrativo.

*Consejo Editorial*

## Reseñas

---

### *BASE CIENTÍFICA DEL DESARROLLO DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL CONTROL DE VACUNAS COMO PARTE ILUSTRATIVA DE LA EVOLUCIÓN Y LA DINÁMICA DE LA CIENCIA*

MSc. Mario Landys Chovel Cuervo

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

#### Resumen

Tradicionalmente los ensayos de potencia en animales han jugado el papel fundamental en el control de calidad de vacunas y otros inmunobiológicos en función de asegurar su calidad, seguridad y eficacia antes de su comercialización. Sin embargo, aspectos de índole ética, económica, social y la propia evolución de la ciencia en todas sus esferas han generado un movimiento para el desarrollo de métodos alternativos que pretenden refinar, reducir o reemplazar los ensayos de animales, limitando así la utilización de los mismos con fines de experimentación científica. Este trabajo pretende mostrar que el desarrollo de tales métodos no puede ser empírico, sino poseer una base científica sólida, acorde con el desarrollo alcanzado por la ciencia en los últimos decenios. Los avances logrados en este sentido por los esfuerzos mancomunados de científicos de entidades productoras de vacunas y Autoridades Reguladoras de Medicamentos, así como instituciones de alcance global y gran interés en la temática, resultan alentadores para la futura proyección de desarrollo de alternativas a los ensayos en animales, más variables, engorrosos, inexactos, poco reproducibles y costosos, sin evitar el aspecto ético de este asunto. En nuestra región y en Cuba, se aprecia un avance promisorio en la temática, que nos ubica en una privilegiada posición con respecto a países del Tercer Mundo.

**Palabras claves:** Métodos Alternativos, Ciencia

#### Introducción

Las vacunas son consideradas las más efectivas herramientas para la prevención de enfermedades infecciosas. De hecho, el uso de las vacunas y demás inmunobiológicos, junto a mejoras en

aspectos de higiene, dieta y alojamiento, tuvo un impacto fundamental en la reducción de la mortalidad y la morbilidad de un buen número de enfermedades infecciosas a partir del siglo XIX. En los años venideros la importancia de estos productos biológicos continuará incrementándose tomando en cuenta, entre otros factores, la necesidad de erradicación de enfermedades, a nivel global, la emergencia de cepas de bacterias resistentes a antibióticos y la reemergencia de algunas infecciones virales y bacterianas que se consideraban virtualmente erradicadas.

Hasta el momento, y a pesar de los nuevos avances en vacunología, la producción de la mayoría de las vacunas comercializadas aún descansa en técnicas convencionales, que incluye la atenuación, inactivación o detoxificación de la cepa de microorganismo o toxina para adecuarla a los propósitos de la inmunización. Dado que varios de estos pasos en la producción de vacunas pueden afectar la calidad del producto resultante, es esencial desarrollar ensayos extensivos de seguridad y eficacia lote a lote para asegurar que el producto es inocuo y capaz de inducir protección inmunitaria tras la inmunización [1].

Tradicionalmente los animales de laboratorio han jugado el papel fundamental en el control de calidad de las vacunas, lo que inevitablemente, ha extendido su uso. Los animales de experimentación se utilizan, tanto para los ensayos de seguridad, como para los de potencia o actividad. Sin embargo, los ensayos de seguridad (específicos e inespecíficos), utilizan un número bastante limitado de animales. Tal es el caso del ensayo de Seguridad General o Inocuidad, que utiliza por lote 5 ratones y sólo 2 curieles.

Resulta diferente la situación de los ensayos de potencia en animales, que utilizan un número significativamente grande de animales y por su diseño pueden implicar un severo estrés y sufrimiento para los mismos [1-2]. Ejemplo de lo anterior lo tenemos en los ensayos de potencia para vacunas inactivadas, que en su mayoría se trata de ensayos de reto o desafío en los cuales la protección inducida por la vacuna es evaluada por reto del animal inmunizado con el microorganismo virulento o la toxina, siendo el punto final del ensayo la observancia de síntomas clínicos o la letalidad.

En los últimos años, sin embargo, se estima que se deben reducir las cantidades de animales utilizados en ensayos de control debido a los factores siguientes:

- La evolución del concepto de control de calidad, dirigido más bien a asegurar la consistencia de un producto que ya ha demostrado ser seguro y eficaz.
- El desarrollo de una nueva generación de vacunas y productos biológicos bien definidos y caracterizados desde el punto de vista molecular, lo cual reduciría la necesidad del extensivo control por ensayo que se realiza hoy en día.

- La prioridad que se le está otorgando al desarrollo e implementación de métodos alternativos a los ensayos clásicos en animales [1].

Es indudable que los métodos alternativos poseen una serie de ventajas sobre los ensayos en animales, entre ellas el hecho de que resultan más económicos, menos variables, prolongados y engorrosos. Sin embargo, su introducción tiene que tener una base científica demostrada, sustentada en aspectos de índole económica, social, ética y de seguridad, además de poseer un estudio de correlación con los ensayos en animales o los resultados en ensayos clínicos que permitan evaluar su factibilidad como ensayo alternativo, basado en el principio de las 3Rs, descrito por Russell y Burch. La introducción de un ensayo alternativo para reemplazar, refinar o reducir el uso de animales de experimentación, no puede, aún en los casos de mayor urgencia, ser un proceso empírico o subjetivo, sino que requiere del conocimiento del estado del arte del desarrollo de métodos alternativos y del consenso internacional de la comunidad científica en torno al tema. De hecho, el largo proceso de consenso internacional que amerita la normalización de un método alternativo en el ámbito internacional, ha limitado su aplicación en la actualidad. Sin embargo, la gran variabilidad de los ensayos biológicos y lo poco reproducibles que suelen ser, así como pobremente predictivos de la respuesta en humanos son, entre otras limitantes, razones más que suficientes para involucrar a un número creciente de instituciones de la comunidad científica en esta temática.

La generación de métodos alternativos resulta un proceso costoso que en ocasiones sólo pueden asumir, de forma solvente, los países del Primer Mundo. Sin

embargo, es justo reconocer las iniciativas que en este sentido se realizan en nuestra área geográfica y en Cuba, con resultados muy alentadores y promisorios [3].

**Desarrollo de métodos alternativos.  
Premisas y resultados alcanzados**

***Utilización y limitantes de la experimentación animal para actividades de control de vacunas***

Se estima que aproximadamente el 10 % de los animales que se utilizan en la Unión Europea son requeridos para su uso en ensayos de potencia de vacunas humanas y veterinarias. En nuestra región, y por sólo citar algunos ejemplos, los Laboratorios Nacionales de Control de Brasil (INCQS) y México (LNSP), utilizan anualmente un promedio de 150000 ratones y 4200 curieles para ensayos de actividad y seguridad de vacunas y sueros. En el caso de Cuba, el CIGB (fabricante de la vacuna recombinante Antihepatitis B), utilizó durante muchos años aproximadamente 18000 ratones Balb/C para el control de la potencia de su vacuna.

En la Tabla 1, se puede observar que aún existe un número apreciable de vacunas que requieren de forma obligatoria la utilización de una cifra significativa de animales para demostrar calidad y eficacia, sin incluir los ensayos de seguridad.

Como ya se abordó en la introducción, las vacunas (en particular las inactivadas), representan un gran desafío, desde el punto de vista del control, por los peligros potenciales para la salud humana que pueden hallarse en el producto terminado, derivado de los tratamientos aplicados durante la producción. A partir de este postulado, se ha asumido como una regla que el comportamiento de una vacuna humana en un modelo animal debe mimetizar de alguna forma el comportamiento de la misma en humanos,

lo cual sería la prueba más fehaciente de la calidad y eficacia de dicho producto.

Sin embargo, se ha demostrado que el ensayo de potencia es una útil herramienta, pero no es por sí mismo un modelo para la predicción de la eficacia clínica, sino que ésta estará más bien condicionada al conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, los mecanismos protectores y la disponibilidad de modelos animales adecuados. Con pocas excepciones (el caso de vacunas de células completas de pertussis), el cumplimiento de las especificaciones del ensayo de potencia en animales, sólo es sugestivo sobre la eficacia de la vacuna. Para lograr un acercamiento más objetivo, se requeriría de una correlación entre la potencia y la eficacia, lo que implicaría la nada ética posibilidad de vacunar humanos con vacunas de potencia subestándar.

A ello, debemos sumar la gran variabilidad inherente a los ensayos con animales, lo cual provoca un gran número de invalidaciones y repeticiones de ensayos. Por sólo citar un ejemplo: la División de Vacunas del Buró de Productos Biológicos y Radiofarmacéuticos de Canadá reportó la invalidación del 41% de los ensayos de componente pertussis, 21% de componente tetánico y 23% de componente diftérico en vacunas combinadas en un período de apenas 15 meses. Este resultado tuvo causas variables como el no cumplimiento de importantes criterios de aceptación de los ensayos en cuestión como la linealidad, el paralelismo, la Dosis Efectiva 50 en el rango esperado y relación significativa dosis - respuesta. No es casual que en este caso el mayor porcentaje de invalidez se hallara para un ensayo como el de vacuna pertussis, que es un ensayo de reto, que involucra un número elevado de animales, es muy poco reproducible, no guarda

relación con la clínica e implica por diseño un considerable estrés para los animales. Algo similar ocurre con otros ensayos de reto en animales como es el caso de los ensayos de potencia para vacunas contra la Rabia y la Leptospirosis.

Los ensayos in vivo poseen el inconveniente adicional de que son prolongados (pueden durar 21, 28 o hasta 42 días, sin contar el tiempo requerido para la recepción y adaptación de los animales), y costosos, no sólo por concepto de lo que hay que pagar por los animales, sino porque se incrementan los costos asociados a uso de instalaciones y equipos, salario y tiempo del personal involucrado, entre otros aspectos [4-5].

***Base Científica del desarrollo de los métodos alternativos. Principales resultados***

Como principio general, los ensayos de potencia en animales han sido diseñados para medir la habilidad de una vacuna para proteger contra el posterior desafío con el componente activo responsable de la patogenicidad. Y de hecho, puede concluirse que el uso rutinario de tales métodos no ha resultado en la liberación de vacunas inefectivas. Sin embargo, en la actualidad existe un grupo de métodos alternativos que han sido desarrollados y propuestos como variantes a estos ensayos de reto.

Resulta imposible discutir el desarrollo de un método alternativo sin una clara comprensión del propósito para el cual el ensayo será utilizado. Es imprescindible discriminar entre procedimientos de ensayo para la investigación – desarrollo de vacunas, evaluación de productos novedosos, vacunas en nuevas presentaciones y sistema de liberación, estudios preclínicos o preregistro de aquellos utilizados para el control de

calidad de vacunas registradas y productos bien establecidos. De hecho, puede considerarse que los segundos son un elemento de los primeros; de ahí que el desarrollo de cualquier método alternativo confiable deba cursar por la comprensión del mecanismo de protección de la vacuna, lo cual implica tanto el mecanismo de inducción de la respuesta inmune protectora como el modo de acción de la entidad patogénica que produce la enfermedad. Tales métodos pueden reemplazar exitosamente los modelos animales para protección.

Sin embargo, el actual conocimiento científico aún muestra limitantes a la hora de diseñar este tipo de métodos alternativos ideales. La utilización de inmunoensayos como métodos alternativos, con el empleo de anticuerpos monoclonales, mejora la especificidad y confiabilidad de tales ensayos, pero poseen la limitante de no ser capaces de discriminar entre todos los dominios del antígeno requeridos para la función biológica, así como entre anticuerpos protectores y no protectores. Además, tales métodos alternativos deben mostrar correlación con los ensayos en animales y aquí aparece otro inconveniente consistente en que muchos de los ensayos en animales no guardan relación con la clínica o se desconoce su relevancia para el desempeño de la vacuna en humanos. Por esta razón surge un criterio aplicado a la utilización de los métodos alternativos, los cuales deben estar dirigidos a demostrar consistencia más que a establecer la eficacia real de una vacuna.

Para algunos productos no se considera posible la sustitución de los modelos animales por ensayos alternativos en un futuro cercano. Por tanto, será difícil adoptar métodos in vitro o serológicos para aquellos casos donde la protección no

sea dependiente de la respuesta de anticuerpos, aunque esto no implica la aplicación de variantes con alcances limitados.

En el análisis para la relevancia de la generación de métodos alternativos para sustituir ensayos en animales, deben considerarse los siguientes aspectos:

- Existen diferencias entre las respuestas inmunes de los animales de laboratorio y las especies blanco, incluyendo a los humanos.
- En ensayos de reto, el microorganismo, para hacer el desafío es una cepa de laboratorio definida, la cual puede diferir de las cepas que producen la infección natural y su ruta de infección. Tal es el caso de pertussis, donde el reto se hace intracerebralmente y la infección natural tiene lugar a través del tracto respiratorio.
- Los ensayos serológicos alternativos podrían medir anticuerpos protectores y no protectores.

De modo que el análisis para considerar la sustitución de un ensayo en animales, por uno alternativo, debe ser caso a caso. No obstante, y pese a la complejidad de este proceso, existen métodos alternativos que ya se están aplicando en el uso rutinario, según se puede observar en la Tabla 2.

También, en los ensayos de seguridad se han incorporado de forma rutinaria, alternativas como el LAL, generada como variante al ensayo en conejos.

En la actualidad se ha generado un número considerable de métodos alternativos para el control de vacunas que se hallan en una fase variable de implementación y aceptación, como se aprecia en la Tabla 3.

En otras oportunidades se ha apreciado la correlación entre algunos parámetros físico-químicos de la vacuna y la eficacia clínica. Tal es el caso de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b, en la cual

se ha visto que datos derivados de ensayos físico-químicos como la cantidad de polisacárido libre, la cromatografía de exclusión molecular o la resonancia magnética nuclear, poseen una gran relación con la inmunogenicidad en niños. Esto es debido a que tales índices brindan información sobre la distribución molecular y el grado de conjugación y estabilidad de la vacuna, requisitos esenciales para una buena respuesta inmune. Este hallazgo los ha convertido en ensayos predictivos de la eficacia, sobre todo porque hasta el momento no existen modelos animales adecuados para tal propósito. Esto no implica que en la actualidad se trabaje en el desarrollo de un modelo animal adecuado para esta vacuna y alternativas basadas en métodos biológicos.

En aquellos casos, en que no resulte posible sustituir completamente un método in vivo por uno alternativo, se deben considerar los siguientes aspectos:

- Utilizar los ensayos in vivo en una fase temprana de producción y liberación de los lotes finales por los datos in vitro.
- Realización de ensayos in vivo sólo si existen cambios relativos a la composición del producto final.
- Evaluación paralela durante un período limitado de tiempo de ensayos in vivo e in vitro, y, luego de acumular suficiente información, evaluar el producto registrado sólo por ensayo in vitro.
- Utilización de ensayos de dilución única validados y otros modelos animales simplificados.

Como puede apreciarse, existe una excelente respuesta de los científicos a la problemática de la experimentación animal, dirigida a la sustitución de los ensayos in vivo o en caso de que no sea posible, al refinamiento del método o la disminución del uso de animales en el

ensayo. No obstante, la aceptación reguladora de los métodos alternativos es un proceso extenso, en el cual reciben prioridad aquellos ensayos que involucran la mayor cantidad de animales y el mayor nivel de estrés y sufrimiento para los animales, aunque esto depende del desarrollo del estado del arte para la vacuna y el método en cuestión.

Según ECVAM el período de desarrollo de métodos alternativos y su aceptación en guías o normas internacionales puede variar entre 9 y 12 años, aunque esto es una estimación [6-11].

#### ***Breve reseña de la experiencia en Cuba e impacto social del desarrollo de métodos alternativos***

En nuestro país, se trabaja en la actualidad en diversos métodos alternativos con grado variable de aceptación. Tanto el fabricante de vacuna recombinante Antihepatitis B, como el Laboratorio de Biológicos de la Autoridad Reguladora de Medicamentos, han diseñado e implementado métodos de potencia in vitro para dicha vacuna que difieren de los kits comerciales disponibles en la actualidad y que poseen aceptación a nivel mundial.

En estos momentos, se están evaluando métodos alternativos cuya aceptación reguladora global está por terminar o en progreso, como es el caso de los ensayos en células Vero para potencia, Toxicidad específica y reversión para componente diftérico en vacunas, el ELISA ToBI para vacunas de tétanos, el ensayo de una inmunización de FDA para potencia in vivo de difteria y tétano.

De igual forma, existen proyectos, algunos en curso, para el desarrollo de métodos alternativos para vacunas contra *Haemophilus influenzae*, Rabia, *Leptospira*, Meningo B, Inmunoglobulina

Antitetánica y Anti-D, y alternativas al ensayo de pirógeno. En algunos casos, se realizan aportes al estado del arte de la temática, explorando nuevos caminos y enfoques y examinando nuevas variantes de métodos alternativos establecidos o bajo estudio.

En nuestro país y en el mundo, la generación de métodos alternativos posee ante todo una gran vinculación con el desarrollo científico alcanzado hasta el momento. La creación de equipos multidisciplinarios y multicéntricos y la celebración de congresos, talleres, entrenamientos, proyectos de investigación, cursos, seminarios, revistas especializadas sobre esta temática, constituye el mejor ejemplo de la relevancia de la misma en la actualidad, la cual está aparejada no sólo con la necesidad de contar con productos biológicos y métodos de ensayo para su control mejor caracterizados, sino con el propio desarrollo de la ciencia y la tecnología, que posibilita su aplicación exitosa en la consecución de tales fines.

No puede obviarse el aspecto ético del asunto. Las protestas de los partidos verdes y otras sociedades protectoras de los animales y del medio ambiente, fuertes cuestionadoras de la experimentación animal, han llevado a la comunidad científica a aplicar la “mejor ciencia” en función de reducir, refinar y/o reemplazar el uso de animales en ensayos sin que esto implique pérdida de información sobre la caracterización de los productos biológicos o afectación de la información reguladora necesaria para registrar los productos a ser comercializados.

Desde el punto de vista económico existe un impacto innegable y mensurable. El desarrollo de métodos alternativos implica la utilización de técnicas analíticas cuya duración es de 1 a 3 días, en cambio los

ensayos en animales duran entre 7 y 42 días. La sustitución de los ensayos en animales traería beneficios económicos pues se ahorra el costo de mantenimiento y crianza de los animales, el tiempo de utilización (y cantidad) de técnicos, equipos, materiales necesarios para la experimentación animal, así como por concepto de uso de las instalaciones y salario del personal involucrado. Pero además, incluso en aquellos casos donde no es posible eliminar completamente el uso de animales, un menor número de animales y de dosis reduce la cantidad de producto que hay que destinar para ensayos de control. Adicionalmente, el producto llegará más rápido al mercado si es liberado por ensayos *in vitro* que si debe esperar por los prolongados ensayos en animales, lo cual tiene un impacto en la competitividad de los productos biológicos, de gran demanda y necesidad a nivel mundial.

Considero que aunque todo lo anterior tiene que ver con la sociedad, la introducción, desarrollo, validación y establecimiento de métodos alternativos deriva finalmente en productos biológicos mejor caracterizados, destinados a la protección de la población mundial, o sea, los métodos alternativos surgen como una necesidad científica, pero ante todo como una necesidad social.

La tesis de Kuhn subraya la autonomía relativa de la ciencia: podrán existir demandas sociales, pero estas tienen que ser traducidas en términos de problemas científicos y por ello se exige su incorporación al tejido conceptual de la ciencia que proviene del paradigma vigente. Pero, aquí se absolutiza un lado de la dinámica más general: falta por considerar lo que Engels indicó claramente: una necesidad técnica impulsa más a la ciencia que diez universidades, es

decir, no existe una acumulatividad de saber absolutamente al margen de las demandas sociales. Sobre todo en nuestros días el papel de tales exigencias en la dinámica de la ciencia, en la definición de la ciencia que ha de practicarse y por ende en el rumbo que ella ha de tomar, es decisivo [12].

### Referencias Bibliográficas

- [1] Di Fabio y cols. Adoption of 3 Rs Alternatives for Regulatory Testing of Vaccines in the Developing World: Possibilities and Barriers. Dev. In Biologicals. 2002; Vol 111: 195-198.
- [2] Calver GA. Implementation of the 3Rs in Regulatory Testing of Vaccines in Canada. Dev. In Biologicals. 2002; Vol 111: 207-212.
- [3] Hendriksen CFM y cols. Alternatives to Animal Testing in the Quality Control of Immunobiologicals: Current Status and Future Prospects. ECVAM Workshop Report 4. ATLA 1994; 22: 420-434.
- [4] Stephens ML y cols. Animal pain and distress in Vaccine Testing in the United States. Dev. In Biologicals. 2002; Vol 111: 213-216.
- [5] César Pérez y cols. Introducción a la Experimentación Animal. Universidad de León. 1999.
- [6] Morton DB y cols. Best Animal Care Practices in the Production and Control of Biologicals. Dev. In Biologicals. 2002; Vol 111: 221-225.
- [7] Sesardic D: Requirements for valid alternative assays for testing of biological therapeutic agents. Development in Biological Standardization 1996;86:311-318.
- [8] Hendriksen CFM: Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 31. ATLA 2001;26:747-761.
- [9] Hendriksen CFM: Alternatives to animal testing in the quality control of immunobiologicals: current status and future prospects. The report and recommendations of ECVAM workshop 4. ATLA 1994;22:420-434.
- [10] Griffiths E: Assuring the quality of vaccines: regulatory requirements for licensing and batch release, in A Robinson (ed): Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press 1996:269-288.
- [11] Balls M: The validation of alternative test method. ATLA 1995;23:884-886.
- [12] Núñez Jover E. La Ciencia y la Tecnología como problemas sociales. Ed. Ciencia y Técnica, 1995.

Recibido: 3 de septiembre de 2004

Aceptado: 22 de octubre de 2004

**Tabla 1. Relación de vacunas de uso humano y veterinario que en la actualidad requieren la realización de ensayos en animales como parte del proceso de liberación de cada lote de vacuna final.**

Tipo de vacuna	Vacunas humanas	Vacunas veterinarias
Vacunas de toxoides	Difteria, Tétanos	Tétanos, Clostridium spp.
Vacunas bacterianas inactivadas	Haemophilus influenzae tipo b (Hib), pertussis	Leptospira, erysipelas, E. coli
Vacunas virales inactivadas	IPV, Rabia	Rabia, parvovirus

**Tabla 2. Relación de vacunas de uso humano y veterinario para las cuales se han desarrollado y aceptado métodos alternativos.**

Tipo de vacuna	Vacunas humanas	Vacunas veterinarias
Vacunas bacterianas vivas	Vacuna antitifoídica oral, BCG	Brucellosis
Vacunas de polisacáridos	Vacunas meningocócicas (de polisacáridos) y pneumocócicas	-
Vacunas virales vivas	Sarampión, papera, rubeola, Polio oral	Parvovirus
Vacunas virales inactivadas	Influenza, Hepatitis A, Hepatitis B	Leucosis felina

**Tabla 3. Relación de métodos alternativos bajo evaluación.**

Método alternativo	Laboratorio coordinador	Estatus actual
ELISA y ELISA ToBI para potencia de vacunas tetánicas	RIVM, Holanda	Finalizado el estudio en 1999. Aceptación reguladora en progreso.
Kits comerciales de ELISA para vacunas antirrábicas humanas.	RIVM, Holanda	Finalizado en 1999.
Ensayo de microaglutinación para la potencia de vacunas de Leptospira hardjo.	PEI, Alemania.	Finalizado en el 2000. Aceptación reguladora en progreso.
Valoración de relevancia de ensayo de Inocuidad en vacunas veterinarias.	AGAATI, Holanda	Finalizado en 2001. Aceptación reguladora concluida.
Ensayo en células Vero para potencia de vacunas de difteria.	RIVM, Holanda	Finalizado en 1999, Aceptación reguladora concluida.
Ensayo en células Vero para Toxicidad específica y reversión a la toxicidad de vacunas de difteria	RIVM, Holanda	Iniciado en el 2001
Ensayo de sangre completa como alternativa al ensayo de pirógenos en conejos	PEI, Alemania	Finalizado en 1999. Aceptación reguladora en progreso.

## REVISIÓN SOBRE EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-csf). PROPIEDADES Y MÉTODOS DE ENSAYO DE POTENCIA

Dra. Diadelis Ramirez, Lic. Natacha Reyes, Lic. Ana Lara Sterling, MSc. Mario Landys Chovel

Laboratorio de Control de la Calidad de Biológicos, CECMED

### Resumen

En el presente trabajo se realiza una revisión sobre las propiedades y métodos de ensayo de potencia del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-csf). Se abordan las características de esta citoquina – estimulante de la producción de neutrófilos en la médula ósea - su identificación, estructura, las propiedades del receptor de G-csf, el clonaje del gen que codifica para el G-csf, su papel en la hematopoyesis y la utilidad de esta citoquina en distintas enfermedades. Los principales bioensayos para la determinación de potencia son descritos en este artículo, así como el efecto anti-inflamatorio del G-csf.

**Palabras claves:** G-csf, citoquina, neutrófilos.

### Introducción

Las citoquinas son mediadores fundamentales de la comunicación intercelular que aparecen como un nuevo grupo terapéutico en varias disciplinas. En oncología, se utilizan IL-2, interferones (IFNs), factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros, para el manejo de leucemias y tumores sólidos avanzados. En los defectos de la hematopoyesis, se utilizan la eritropoyetina y el G-csf; en las enfermedades virales como la hepatitis B y C tienen utilidad los IFNs, y en el SIDA, se están llevando a cabo ensayos clínicos con IL-2. En el campo de las inmunodeficiencias primarias, existen varias patologías que en la actualidad son susceptibles de ser manejadas con varias citoquinas [1-3].

Las citoquinas han sido descubiertas en mezclas complejas por observación de sus efectos en los sistemas biológicos. Estos efectos, determinan la propiedad definitiva

o una de las diversas propiedades de las citoquinas, lo que constituye la base de los bioensayos [4].

### Desarrollo

#### *Factor estimulante de colonias de los granulocitos (G-csf)*

El G-csf es un miembro de la familia de los factores de crecimiento de las glicoproteínas el cual controla la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas y funcionalmente activa las células hematopoyéticas maduras [5].

El G-csf murino fue inicialmente descrito como un activador estimulante de colonias en el suero de ratones tratados con endotoxinas, lo cual inició la diferenciación terminal de la línea celular mielomonocítica leucémica WEHI-3BD<sup>+</sup> [6]. El nuevo factor de crecimiento identificado fue descrito como una glicoproteína hidrofóbica con un peso molecular aproximado de 24 o 25 kDa, conteniendo un grupo de ácido neuramínico y al menos un puente disulfuro [7].

Después de la identificación del G-csf murino, fue descubierta una molécula humana con actividades análogas. Del medio condicionado por el crecimiento de la línea celular de carcinoma de vejiga, fue caracterizada una actividad la cual indujo la diferenciación de las células murinas WEHI-3BD<sup>+</sup> [8]. Al mismo tiempo, otros grupos descubrieron la producción de G-csf por células escamosas de la línea

celular de carcinoma CHU-2 (25) y por la línea celular de hepatoma SK-HEP-1 [9, 10].

El clonaje del gen que codifica para el G-csf y la producción de proteínas recombinantes, facilitaron en gran medida la obtención de conocimientos acerca de las propiedades bioquímicas y biológicas del G-csf. Algunas de las características fundamentales son [11, 12]:

1. El gen que codifica para el G-csf humano existe en una sola copia y ha sido localizado por análisis de hibridación de Southern y posteriores estudios han determinado que este gen se localiza en el cromosoma 17q11-22; el gen humano consta de 5 exones y 4 intrones expandidos sobre el locus de aproximadamente 2,3 kb.
2. La producción de la proteína de G-csf no es constitutiva y puede ser inducida por varios agentes estimuladores como lo son lipopolisacáridos, factor de necrosis tumoral, interleuquina 1, interferón gamma, etc.
3. La expresión del G-csf es regulada por una combinación de mecanismos transcripcionales y post transcripcionales.

***Papel del G-csf en la hematopoyesis y en las funciones efectoras en células maduras***

Las células sanguíneas circulantes en el organismo son la fuente de poblaciones de células hematopoiéticas precursoras indiferenciadas presentes en la médula ósea. Para mantener un adecuado número de células circulantes, éstas deben ser sustituidas a la misma velocidad de pérdida por envejecimiento. Este recambio es regulado por una red compleja de moléculas estimulantes del crecimiento. Una de estas moléculas es el G-csf. Su efecto hematopoiético está concentrado sobre las células de la línea de los

neutrófilos. En experimentos con roedores la inyección de G-csf produjo neutrofilia por el incremento de la producción de neutrófilos en la médula [13]. El tratamiento de humanos con G-csf también resultó en neutrofilia y produjo una movilización de las células progenitoras sanguíneas periféricas [14].

Distintos experimentos realizados evidencian que el G-csf induce alteraciones significativas en la actividad biológica de los neutrófilos maduros, lo cual pudiera aumentar la defensa del huésped en respuesta a patógenos que invaden, por ejemplo, las bacterias [15].

***El receptor de G-csf***

Las actividades biológicas del G-csf son mediadas por receptores específicos. Estudios han demostrado la existencia de receptores de alta afinidad saturables y específicos para el G-csf de células murinas de la línea de neutrófilos [16, 17]. Recientemente ha sido mostrado que monocitos humanos expresan receptores funcionales para el G-csf y estos receptores atenúan la liberación de citoquinas proinflamatorias en monocitos activados [18]. El clonaje molecular del DNA que codifica para los receptores murinos y humanos ha mostrado que las proteínas receptoras son polipéptidos únicos transmembrana de 812 y 813 aminoácidos, respectivamente, con un 73 % de semejanza al nivel de nucleótidos y un 63 % al nivel aminoacídico. [19].

***Efecto anti-inflamatorio del G-csf***

Dado que el G-csf incrementa el número de neutrófilos y la función de los mismos, se pudiera asumir que el tratamiento con G-csf pudiera agravar la respuesta inflamatoria y la destrucción del tejido, pero sorprendentemente, el G-csf solo estimula la defensa anti-infectiva de neutrófilos mientras el potencial

destrutivo de linfocitos y monocitos es inhibido [20]. Experimentos con ratones tratados con G-csf, mostraron protección contra una dosis letal de lipopolisacáridos y esta protección fue acompañada por una disminución de los niveles de TNF- $\alpha$  en el suero [21], animales con G-csf sensibilizados con galactosamina fueron protegidos del daño hepático mediado por células T [22].

Estos efectos anti-inflamatorios del G-csf fueron también observados en estudios in vitro. La estimulación de sangre completa humana con G-csf in vitro, en un rango de concentraciones de 10 a 30 ng/ml, atenuó significativamente la liberación inducida por lipopolisacáridos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IFN- $\gamma$  [23].

El mecanismo por el cual el G-csf ejerce influencia en la liberación de citoquinas linfocíticas ha sido solo parcialmente elucidado. Estudios por citometría de flujo evidenciaron que el G-csf es capaz de afectar directamente los monocitos sin la participación de otros leucocitos y sus mediadores; el G-csf parece inhibir los procesos proteolíticos de la pro IL-1 $\beta$  a la IL-1 $\beta$  madura [24].

#### ***Ensayos Biológicos para la determinación de potencia de las citoquinas***

Los ensayos biológicos están basados en los efectos biológicos de las citoquinas, por ejemplo, la proliferación celular, la actividad citotóxica/citostática, los efectos cinéticos, la actividad antiviral, la formación de colonias o la inducción o secreción de otras moléculas de citoquinas o no citoquinas [25].

Los bioensayos pueden usar los cultivos primarios de células obtenidos de animales o de líneas celulares autónomas o dependientes de citoquinas. Estos ensayos son raramente específicos para una

citoquina particular y pueden responder a un número de citoquinas y a otras moléculas tales como timocitos, por ejemplo, ensayos basados en líneas celulares de leucemia mieloide aguda. En estos ensayos la especificidad para una citoquina particular puede ser establecida por el uso de un anticuerpo neutralizador monoespecífico; esta aproximación es crucial para confirmar la presencia de citoquinas en muchas muestras biológicas. En algunos casos los ensayos biológicos pueden subestimar el contenido proteico de citoquinas de una muestra biológica debido a la presencia de moléculas inhibitorias, por ejemplo, proteínas de unión, receptores solubles, antagonistas receptores o inhibidores de citoquinas tales como (TGF-B) [26, 27]. Es también probable que bioensayos pudieran sobreestimar el contenido de citoquina de una muestra debido a las interacciones sinérgicas entre las citoquinas individuales en la muestra [28].

#### ***Comparación de los bioensayos con los inmunoensayos y los ensayos de unión al receptor***

Parece ser imposible distinguir, por el uso de bioensayos, las especies moleculares diferentes de algunas citoquinas, el ejemplo clásico de esto son las IL-1  $\alpha$  y  $\beta$  las cuales, aunque son muy diferentes estructuralmente, parecen poseer propiedades biológicas idénticas, al menos en células homólogas. En estos casos los inmunoensayos pueden ser usados para cuantificar específicamente las diferentes formas moleculares sobre la base de la proteína [29, 30]; estos ensayos se utilizan como una alternativa a los ensayos biológicos aunque ellos pueden detectar las moléculas de citoquinas biológicamente desnaturalizadas, así como complejos de citoquina-receptor inactivos

[31]. Los inmunoensayos necesitan ser cuidadosamente validados para eliminar los artefactos, particularmente si estos ensayos son usados para el análisis de muestras clínicas [32-34].

Los ensayos de unión a receptores son frecuentemente considerados como un compromiso entre ensayos biológicos e inmunoensayos, ya que ellos son basados en la habilidad de las moléculas de citoquinas de unirse a receptores naturales. Sin embargo, estos ensayos pudieran producir resultados, los cuales no se correlacionan con los ensayos biológicos si algunas moléculas de ligandos son incapaces de inducir la señal de transducción siguiendo la unión al receptor [35, 36].

#### ***Bioensayos para factores estimulantes de colonias***

Clásicamente estos factores son ensayados por su habilidad de estimular la formación de colonias de células diferenciadas de las células progenitoras de la médula ósea en agar suave. El tipo de colonia producida depende del factor a ensayar. En el caso de la IL-3 y el factor estimulante de colonias granulocíticas del macrófago, estimulan la producción de colonias mezcladas de diferentes tipos de células mientras que el G-csf, el factor estimulante de colonia del macrófago y la eritropoyetina, son líneas restringidas y producen predominantemente granulocitos, monocitos y colonias eritroides respectivamente [37, 38].

El ensayo para determinar la actividad del G-csf se basa en la cuantificación de la actividad biológica en Unidades Internacionales (UI/mL). Tanto el método colorimétrico como el radioactivo, se basan en la proliferación de células Gmfs-60 (leucemia mileoide Murina) mediada por G-csf. En el método colorimétrico la

cuantificación se basa en la reducción de sal de tetrazolium a formazan y se lleva a cabo mediante la lectura de absorbancia a 550-600 nm en un lector de placas, y en el segundo método, la cuantificación se realiza por la incorporación de timidina tritiada al ADN celular usando un contador de centelleo [39].

#### ***Indicaciones clínicas aprobadas***

Las dos formas de G-csf recombinante humano en uso clínico son filgrastim y lenograstim las cuales son potentes estimulantes de la granulopoiesis de los neutrófilos y su eficacia ha sido demostrada en la prevención de las complicaciones infecciosas de algunos estados neutropénicos. Los mismos pueden ser usados para acelerar la recuperación neutrofilica de los tratamientos mielosupresivos, disminuye la morbilidad por la quimioterapia con cáncer disminuyendo la incidencia de neutropenia febril, así como la incidencia y duración de infección en pacientes con neutropenia severa crónica. Otras aplicaciones potenciales están siendo evaluadas [40, 41]. La dosis recomendada varía acorde con la patología, por ejemplo, en el caso de la neutropenia febril es 5 µg/kg/día, en los casos de trasplante de médula ósea la dosis recomendada es de 20 -30 µg/kg/día [42].

#### ***Efectos adversos y Seguridad del G-csf***

El G-csf ha sido bien tolerado por los pacientes. En estudios aleatorizados de pacientes con quimioterapia de cáncer, el único efecto adverso significativo que mostró fue el dolor en los huesos, lo cual ocurrió solo en el 15-20 % de los pacientes en estudio y el dolor fue manejado con analgésicos orales simples como el paracetamol con o sin codeína. Analgésicos potentes solo fueron requeridos en raras ocasiones [43]. La

trombocitopenia asociada con su uso pudiera ser una consecuencia de la aplicación continuada de las dosis de quimioterapia más que un efecto específico del G-CSF [44].

### **Consideraciones costo-beneficio**

El G-csf es una droga costosa. El costo para una dosificación de 10 días para la prevención de la neutrofilia febril después de una quimioterapia de cáncer se estima en el orden de \$1283.60 para 10 viales (263 microgramos/vial). Este es el costo estimado, ya que esto fluctúa acorde con los distintos fondos de seguro médico. [45]. El G-csf ofrece seguridad al apoyo hematológico de los pacientes con cáncer que reciben quimioterapia, pero no constituye un tratamiento anticáncer. El uso del G-csf permite a los pacientes recibir la dosis programada de quimioterapia sin reducción de la misma, e incluso, un incremento de estas dosis protegiendo a los pacientes de algunos de los efectos hematológicos mencionados anteriormente [46].

### **Conclusiones**

El G-csf no es solo una citoquina dirigida a neutrófilos, sino también estimula la proliferación y actividad de neutrófilos. Esto tiene influencia sobre los monocitos y linfocitos y limita el potencial pro-inflamatorio de los mismos. Dado su potencial anti-inflamatorio y la mejor defensa anti-bacteriana de los neutrófilos el G-csf ofrece un perfil farmacodinámico único. Bioensayos con mayor especificidad para esta citoquina y nuevas aplicaciones clínicas están en fase de desarrollo.

### **Referencias Bibliográficas**

- [1] Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78-2791-808, 1991.
- [2] Burgess A, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemia cells. *Int. J. Cancer*, 26, 647-54, 1980.
- [3] Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem* 258, 9017-23, 1983.
- [4] Nicola NA. Granulocyte colony-stimulating factor In: Dexter TM, Garland JM Testa NG editors. *Colony-stimulating factors*. New York: Marcel Dekker, 77-109, 1990.
- [5] Oheda M, Hase, Ono M, Ikenaka T. Structures of the sugar chains of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced by chinese hamster ovary cells. *J. Biochem (Tokyo)* 103, 544-6, 1988.
- [6] Welte KE, Platzer E, Lu L, Gabrilove J, Levi E, Mertelsmann R et al. Purification and biological characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 1526-30, 1985.
- [7] Nomura H, Imazeki, OhedaM, Kubota N, Tamura M, Ono M, eta al. Purification and characterization of human granulocyte colony stimulating factor (G-csf) *EMBO J.* 5, 871-6, 1986.
- [8] Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O et al. Molecular cloning and expression of c-DNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 319, 415-8, 1986.
- [9] Le Beau M, Lemons R, Carrino J, Pettenati M, Souza L, Diaz M, Rowley J. Chromosomal localization of the human G-csf gene to 17q11 proximal to the breakpoint of the (15,17) in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 1, 795-9, 1987.
- [10] Simmers RN, Webber LM, Shannon MF, Garson OM, Wong G, Vedas MA et al, Localization of the G.csf gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15,17) in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 70, 330-2, 1987.
- [11] Tsuchiya M, Kaziro Y, Nagata S. The chromosomal gene structure for murine granulocyte colony-stimulating Factors. New York: Marcel Dekker, 77-109, 1990.
- [12] Demetri GD, Zenzie B, Rheinwald J, Griffin JD, Expression of colony-stimulating factor genes by normal human mesothelial cells and human malignant mesothelioma cell lines in vitro. *Blood*, 74, 940-46, 1989.
- [13] Vellenga E, Rambaldi A, Ernst TJ, Ostapovicz D, Griffin JD, Independent regulation of M-CSF and G-csf gene expression in human monocytes. *Blood* 71, 1529-32, 1988.
- [14] Fibbe WE, Van Damme J, Billiau A, Goselink Hm, Voogt PJ, Van Eeden G et al. Interleukin- 1 induces human narrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte colony-

- stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 71, 430-5, 1988.
- [15] Barsig J, Bundschuh DS, Hartug T, Bauhofer A, Sauer A, Wendel A. Control of fecal peritoneal infection in mice by colony-stimulating factors. *J. Infect Dis*, 174, 790-9, 1996.
- [16] Corey SJ, Burkhardt AL, Bolen JB, Geahlen RL, Tkatch LS, Twardy DJ. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosinase kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 4683, 1994.
- [17] Hibbs ML, Tarlinton DM, Armes J, Grail D, Hodgson G, Maglito R et al. Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83, 301/311, 1995.
- [18] Shieh JH, Peterson RH, Moor MS. Modulation of granulocyte colony-stimulating factor receptors on murine peritoneal exudate macrophages by tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol*, 146, 2648-53, 1991.
- [19] Avalos BR, Gasson JC, Hedvat C, Quan SC, Baldwin GC, Weisbart RH et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*. 75: 851-7, 1990.
- [20] Gorgen I, Hartung T, Leist M, Niehoster M, Tiegs G, Uhlig S et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Immunol*, 149, 918-24, 1992.
- [21] Yong KL, Linch DC. Differential effects of granulocyte-and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (G-and GM-CSF) on neutrophils adhesion in vitro and in vivo. *Eur. J. Haematol*, 49, 251-9, 1992.
- [22] Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 5, 221-5, 1998.
- [23] Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. The effect of three human recombinant hematopoietic growth factors on phagocyte oxidative activity. *Blood*, 81, 1863-70, 1993.
- [24] Hartung, Von Aulock S, Wendel A. Role of granulocyte colony stimulating factor in infection and inflammation. *Med. Microbiol. Immunol*. 187, 61-69, 1998.
- [25] Hartung T. Immunomodulation by colony-stimulating factors. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol*, 136, 1-164, 1999.
- [26] Stiehm ER. Conventional therapy of primary immunodeficiency diseases In: Smith CIE Ochs HD, Puck JM. Eds. *Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach*. New York. Oxford University press. 448-458, 1999.
- [27] European Pharmacopeia Chapter 5.3, pp2-32, 1998.
- [28] Nakaki S, Mizuno K, Kaneta M, Hirai Y. A simple sensitive bioassay for the detection of Interleukin-1 using human melanoma A375 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 154, 1189, 1988.
- [29] Wadhwa M and Thorpe R. *The cytokine handbook* (3<sup>rd</sup> edn) p.855 Academic Press. London.
- [30] Smith CIE, Ochs HD, Puck JM. Genetically determined immuno-deficiency diseases: A perspective. In: Smith CIE, Ochs HD, Puck JM Eds. *Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach*. New York, Oxford University Press, pp, 448-458, 1999.
- [31] Dong F, Lerner AC. Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosinase kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood*, 95, 1656-62, 2000.
- [32] Berridge MV, Tan AS and Hilton CJ, Cyclic adenosine monophosphate promotes cell survival and retards apoptosis in a factor-dependent bone marrow-derived cell line. *Exp. Hematol*. 21, 269-276, 1993.
- [33] Picker SD and Fridovich I. On the mechanism of production of superoxide radical by reaction mixtures containing NADH, phenazine methosulfate, and nitroblue tetrazolium. *Arch. Biochem. Biophys*. 228, 155-158, 1984.
- [34] Vistica DT, Skehan P, Skudiero D, Monks A, Pittman A and Boyd MR. Tetrazolium based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*: 51, 2515-2520, 1991.
- [35] Marshall NJ, Goodwin CJ and Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function Review. *Growth Regulation*, 5, 69-84, 1995.
- [36] Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Meth*. 65, 55-63, 1983.
- [37] Liochev SI and Fridovich I. Superoxide from glucose oxidase or from nitroblue tetrazolium? *Archives of Biochem Biophys*, 318, 408-410, 1995.
- [38] Hammerling Ulf, Kroon J, Sjodin L et al. *In vitro* bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. *J. Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 1-2, 1995.

- [39] Hartung T, Gaviria JM, Garrido Sm, Root RK. G-csf and GM-CSF In: Holland SM, editor. Cytokine therapeutics in infectious diseases. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 185-220, 2001.
- [40] Lieschke GJ, Burgess AW. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (1 and 2). *N Engl J Med* 327:28-35,99-106, 1992.
- [41] Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N Engl J Med* ;325:164-70, 1991.
- [42] Pettengell R, Gurney H, Radford JA, Deakin DP, James R, Wilkinson PM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent dose-limiting neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized controlled trial. *Blood*, 80,1430-6, 1992.
- [43] Trillet-Lenoir V, Green J, Manegold C, Von Pawel J, Gatzemeier U, Lebeau B, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor reduces the infectious complications of cytotoxic chemotherapy. *Eur J Cancer* 29A:319-24., 1993.
- [44] Sheridan WP, Morstyn G, Wolf M, Dodds A, Lusk J, Maher D, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 2, 891-5, 1989.
- [45] Gisselbrecht C, Prentice HG, Bacigalupo A, Biron P, Milpied N, Rubie H, et al. Placebo-controlled phase III trial of lenograstim in bone-marrow transplantation. *Lancet* 343, 696-700, 1994.
- [46] Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg J, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 81, 2496-502, 1993.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

## **MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DESINFECTANTES SOBRE LA FISIOLOGÍA BACTERIANA**

Lic. María de los Angeles Ramos García

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

### **Resumen**

No es fácil determinar el mecanismo de acción exacto de un desinfectante sobre las células bacterianas. La dificultad para analizar el modo de acción de un desinfectante obedece a la distinción entre la fase primaria, (características del modo de acción), y la fase secundaria, (consecuencia de ese mecanismo). Este trabajo constituye una recopilación de información cuyo objetivo principal ha sido describir los efectos de algunos desinfectantes sobre las membranas celulares externa y citoplasmática, así como en el metabolismo energético de la célula y en particular la ruptura de la membrana, la pérdida de permeabilidad y la coagulación del citoplasma en las células bacterianas; en el mismo se hace alusión a la cinética de destrucción de los microorganismos frente a los agentes químicos y a la acción de estos últimos compuestos con diferentes estructuras químicas especialmente en las células bacterianas.

**Palabras claves:** desinfectantes, mecanismos de acción, coagulación del citoplasma.

### **Introducción**

El arte y la ciencia de la desinfección precedieron a la elaboración de la teoría de los gérmenes infecciosos. Inicialmente se observó que ciertos compuestos, cuando se aplicaban sobre cadáveres en descomposición, o se agregaban a las aguas residuales, atenuaban la emanación de malos olores. A partir de tales bases empíricas, el uso de desinfectantes se fue desarrollando hasta formar una ciencia de considerable magnitud. Actualmente, los méritos o defectos de muchos productos, procesos y métodos de evaluación son criticados, sin que los expertos lleguen a un consenso al respecto. Sin embargo, gracias a los adelantos de la química, la microbiología y la biología molecular, los

mecanismos que rigen la acción de los desinfectantes empiezan a ser conocidos [1].

Los desinfectantes modernos se componen de formulaciones complejas que comprenden sustancias químicas unidas a solventes, agentes quelantes, ácidos, bases, productos corrosivos y otros. Se consideran que tienen variaciones considerables en cuanto a términos de pH, dureza, salinidad. En contraposición con los agentes quimioterapéuticos que presentan un alto grado de selectividad para especies bacterianas, los desinfectantes son muy tóxicos para todos los tipos de células, y actúan sobre estas a través de diferentes modos de acción [2].

La aplicación de procedimientos de desinfección data de un largo tiempo atrás en la historia, existiendo diversas evidencias sobre el uso de estos procesos, como citas bíblicas, referentes al uso del fuego y el agua hirviendo con el objetivo de impedir las enfermedades para tratar materiales o vestimentas de soldados que retornaban de las guerras.

La primera referencia de un desinfectante que se tuvo conocimiento fue por Homero en "La Odisea", donde citaba el uso del azufre, en forma de dióxido de azufre (aproximadamente 800 AC), sustancia hoy en día usada también como desinfectante o preservativo de frutas secas, jugos de frutas y vinos. El azufre fue también usado en la edad media durante las grandes epidemias.

La ciudad de Venecia fue una de las primeras en el control sanitario, cuando la

Institución, en 1438, fumigó cargas de navíos a fin de evitar diseminación de enfermedades; obviamente con la evolución se han entendido la aplicabilidad de los procedimientos de desinfección ocurriendo descubrimientos de las causas de enfermedades infecciosas haciéndose parte de la propia historia de la Microbiología [3].

Uno de los primeros investigadores fue Girolamo Fracastoro (1478-1553), colega de Copérnico en la Universidad de Padua, que escribió tres libros sobre las causas de las enfermedades contagiosas, proponiendo que las infecciones eran causadas por el paso de cuerpos diminutos capaces de multiplicarse de una persona a otra. Infelizmente sus conocimientos quedaron establecidos por mucho tiempo hasta que fueron redescubiertos [4].

En el marco de la historia de la Microbiología, el holandés Anton Van Leewenhock (1676), fabricante de microscopios, fue el primer ser humano en ver un microorganismo. En uno de sus experimentos, observó el efecto letal de diversas sustancias, inclusive el vinagre, sobre los que denominaba pequeños animales. A partir de estos experimentos surgieron otros investigadores con la teoría de los gérmenes y las enfermedades [5].

En 1750, Joseph Pringle, un médico inglés, publicó tres interesantes artículos comparando la resistencia a la putrefacción debido a la aplicación de sustancias a las cuales les llamó anti-sépticos. El conocimiento de los desinfectantes químicos se expandió en el siglo XVIII con el descubrimiento del cloro en 1774, por el químico sueco Scheele, seguido del descubrimiento de los hipocloritos, en 1789, por Bertholet un químico francés [6]. Desde la antigüedad se trató de combatir las infecciones aún sin tener los conocimientos científicos que se

tienen en la actualidad, por ejemplo, a mitad del siglo XVIII Louis Pasteur (1822-1895), considerado como el padre de la Microbiología, introdujo términos como el de esterilización. Con las grandes epidemias que surgían, ejemplo son el cólera, tuberculosis, viruela, sífilis entre otras, comenzaron a surgir ideas para combatir estas enfermedades; las medidas sanitarias cobraron especial interés como solución a estas problemáticas. Pasteur, con su trabajo contribuyó a la creación y desenvolvimiento de la Microbiología como ciencia al demostrar que eran los microorganismos los responsables de las enfermedades infecciosas, estableciendo metodologías usadas en la actualidad como fue el proceso de desinfección por un método físico denominado pasteurización.

Destacados fueron también los trabajos de Robert Koch, quien escribió un artículo "Sobre desinfección" en 1881, donde examinó la capacidad de 70 sustancias de destruir microorganismos en diferentes concentraciones y diluciones surgiendo así la primera técnica para ensayar desinfectantes.

Alrededor de 1897, Kroning y Paul, concluyeron en sus experimentos con cloruro de mercurio sobre esporas de *Bacillus anthracis*, que la cinética de muerte seguida por las leyes físico-químicas y que la fracción de la población bacteriana agonizante por unidad de tiempo es constante; ellos observaron que el rango de muerte fue directamente proporcional a la concentración del desinfectante, esta observación había sido confirmada con otros compuestos. La consecuencia práctica era que la desinfección tomaba algún tiempo como resultado de una heterogeneidad de la susceptibilidad de las células de una población bacteriana [7].

Kroning y Paul, en el clásico artículo publicado en 1897, introdujeron un conocimiento científico y moderno sobre la dinámica de la desinfección química, fundamentalmente los principios básicos para la validación de la actividad de los desinfectantes, que de hecho fue a inicios de 1903 que Riedel y Walker presentaron el método del coeficiente fenólico. El desinfectante, conocido como fenol, fue introducido por Joseph Lister en el siglo XIX; como resultado de su aplicación a las infecciones debido a operaciones quirúrgicas, éstas se redujeron, y se inició la ciencia de los desinfectantes. En este siglo, Lister y Semmelweis, demostraron brillantemente en sus experimentos que agentes químicos podían prevenir enfermedades, primero utilizando fenol como antiséptico prequirúrgico, y por último agua clorada para lavar las manos previo al trabajo de obstetricia, alcanzando una reducción significativa de muertes de recién nacidos por fiebre puerperal.

Ya en el siglo XX, muchas sustancias han sido descritas en el campo de la desinfección con la finalidad de usos diversos y aplicación en prácticamente todas las actividades relacionadas en el área de la salud [5,6].

Se define como desinfectante a un antimicrobiano empleado para destruir patógenos sobre objetos inanimados [8]. La desinfección, es el proceso que consiste en eliminar microorganismos infecciosos mediante el uso de agentes químicos o físicos [6].

Se plantea que la desinfección es una ciencia en constante evolución. Nuevos productos químicos con esta acción han aparecido, como las espumas, los nebulizadores, y otros compuestos sintéticos complejos. Las implicaciones tecnológicas, políticas y medioambientales de esta ciencia cobran mayor importancia

lo que tiende a traer complicaciones, pero a su vez revoluciona las prácticas al respecto [7].

En la Unión Europea, se conoce que los ingredientes activos usados en los productos microbicidas constituyen más de 250, aproximadamente 100 de estos productos son comúnmente usados en productos desinfectantes, la mayoría de estas sustancias son clasificadas en distintos grupos químicos [9].

## Desarrollo

### ***Generalidades sobre los posibles modos de acción de los agentes antimicrobianos***

Los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos son variados y complejos, con frecuencia se producen alteraciones secuenciales o simultáneas que dificultan la diferenciación entre los efectos primarios y secundarios. En estudios realizados sobre los posibles modos de acción de los desinfectantes se describe que ellos actúan sobre la membrana externa de la pared celular una vez que las moléculas de desinfectantes han sido ionizadas y absorbidas o repelidas por cargas eléctricas en un primer contacto con la célula. Esto es posible teóricamente porque:

1. Moléculas no polares se encuentran disueltas y penetran en la fase lípida.
2. Sistemas portadores específicos conducen a estas moléculas a través de la membrana.
3. Otras moléculas pudieran ser capaces de provocar disturbios en la organización de la membrana por querer ocupar ciertos sitios.

Muchos desinfectantes actúan sobre el metabolismo energético, influyendo en la producción de ATP, actúan sobre el citoplasma y el núcleo a nivel cromosomal. Las esporas bacterianas no

escapan a la posible acción de estos agentes, por la naturaleza impermeable y presencia de ácido dipicolínico de estas, se hacen más residentes que las formas vegetativas, y la estructura de las esporas se desnaturaliza por la acción de algunos desinfectantes.

***Cinética de destrucción de una población microbiana frente a un agente letal***

Cuando se pone en contacto un agente químico con una población bacteriana se obtiene como resultado una reducción del número de sobrevivientes. La cinética de destrucción de una población microbiana suele ser exponencial, el número de sobrevivientes disminuye en función del tiempo.

Debido a la forma exponencial de la curva del tiempo de supervivencia, cuanto mayor sea el número de células a destruir, más intenso y prolongado será el tiempo que requerirán los microorganismos para ser eliminados. Se conoce que la velocidad de desinfección varía con la concentración del desinfectante, sin embargo, el efecto de la concentración sobre la velocidad no es constante, sino que varía en dependencia del tipo de desinfectante [10].

***Acción de algunos desinfectantes sobre la fisiología bacteriana***

Como se mencionó anteriormente, de forma general, los desinfectantes actúan sobre las células bacterianas alterando la integridad estructural de sus membranas, desnaturalizando proteínas, modificando grupos funcionales y ácidos nucleicos. En función de la clasificación de los ingredientes activos, los desinfectantes van a provocar alteraciones en las células.

Dentro de los agentes químicos que lesionan la membrana celular, se citan los desinfectantes tensoactivos, los cuales se caracterizan por presentar grupos

hidrofilicos e hidrofóbicos. Se conoce que la interfase entre la membrana de una célula bacteriana y el medio acuoso que la rodea, constituye un blanco para la acción de este tipo de agente, que incluye sustancias catiónicas, sustancias aniónicas y compuestos anfotéricos.

En el caso de los compuestos catiónicos (por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario), presentan un residuo hidrófobo que está balanceado por un grupo hidrofílico con carga positiva, como un núcleo de amonio cuaternario; cuando las bacterias se exponen a este compuesto, el grupo con carga positiva se asocia con los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana y como resultado se obtiene una distorsión que provoca pérdida de la semipermeabilidad de la membrana y filtración de compuestos nitrogenados y fosforados contenidos en la célula, penetrando el agente químico y desnaturalizando las proteínas [11].

Los agentes aniónicos (jabones, ácidos grasos), causan una desorganización grosera de la estructura lipoproteica de la membrana celular. Estos agentes que tienen una mayor actividad a pH ácido, son efectivos contra los microorganismos, pero relativamente ineficaces contra las bacterias Gram negativas debido a su membrana externa lipopolisacáridica.

En cuanto a los compuestos anfotéricos, estudios realizados sobre la acción del dodecyl di-aminoetil glicina en dos cepas de *Pseudomona aeruginosa*, demostraron que las propiedades aminoacídicas de esta molécula permitían que estos compuestos entraran a la pared celular y la membrana citoplasmática, provocando picaduras en la pared celular por protuberancias tubulares. Otros tipos de desinfectantes son los compuestos fenólicos que actúan, específicamente, sobre la membrana celular e inactivan enzimas

intracitoplasmáticas, por ejemplo, oxidasa y deshidrogenasa, por formación de complejos inestables. Las moléculas lipofílicas son trampas para los fosfolípidos de la membrana. Cuando la concentración de este agente es baja, los constituyentes celulares como el ácido nucleico y el ácido glutámico son liberados al medio externo, si es elevada su concentración, se inhiben las permeasas causando desnaturalización de las proteínas de las bacterias y lisis de la membrana celular [12].

Los alcoholes, provocan desorganización en la estructura lipídica por penetración en la región hidrocarbonada y desnaturalización de las proteínas celulares. Los alcoholes de cadena corta alteran en mayor cuantía la organización de la membrana que los homólogos superiores.

Entre los agentes que desnaturalizan las proteínas se encuentran, además de los alcoholes, las acetonas, los ácidos y los álcalis; estos últimos ejercen su actividad antibacteriana a través de sus iones  $H^+$  y  $OH^-$  libres, los iones  $H^+$  provocan una hidrólisis selectiva de los ácidos nucleicos, modifican el pH citoplasmático y precipitan las proteínas; los iones  $OH^-$  saponifican los lípidos en la membrana y conducen a la destrucción de estructuras superficiales.

Existen otras sustancias químicas que modifican los grupos funcionales de las proteínas y los ácidos nucleicos. Es conocido que el sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen al sustrato e inician los episodios catalíticos; la inhibición de esta actividad tiene lugar cuando compuestos que contienen mercurio o arsénico se combinan con grupos sulfidrilos; los compuestos como el formaldehído, detergentes aniónicos y

colorantes ácidos reaccionan con los grupos amino e imidazólicos; los compuestos de amonio cuaternario y detergentes catiónicos reaccionan con grupos ácidos.

Las sustancias oxidantes, por otra parte, atacan grupos aminos, indol y el grupo hidroxifenólico de la tirosina. En este grupo los más útiles son los halógenos y el peróxido de hidrógeno que inactivan las enzimas por conversión de los grupos bifuncionales  $-SH$  en la forma oxidada  $S-S$ . En los halógenos se destacan el cloro y el yodo sobre microorganismos que esporulan. El yodo actúa disminuyendo los requerimientos de oxígeno de los microorganismos aerobios, interfiere en la cadena respiratoria y bloquea el transporte de electrones a través de reacciones electrofílicas con enzimas de la cadena respiratoria [13].

Los colorantes no solo se usan para teñir bacterias, se conoce que los básicos son los más efectivos por presentar una actividad marcada por los grupos fosfatos acídicos de las nucleoproteínas y de otros compuestos celulares.

Entre los compuestos de aldehídos, existen tres agentes de especial interés: el formaldehído, el óxido de etileno y el glutaraldehído. Estos compuestos actúan sobre las proteínas provocando desnaturalización, y sobre ácidos nucleicos produciendo alquilación. En el caso del formaldehído ocasiona alquilación de los grupos carboxilos, oxhidrilos o sulfidrilos, por reemplazo directo de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroximetilo.

El glutaraldehído, por su parte, es diez veces más potente que el anterior y su forma de acción es atribuida a la unión de este a grupos sulfidrilos o aminos, pero su blanco específico es desconocido. El óxido de etileno actúa cuando existe la presencia de un hidrógeno lábil disponible en la

célula, de esta forma, el anillo del óxido de etileno se abre y se une a los grupos carboxilos, aminos, sulfidrilos y oxhidrilos de las proteínas, además, reaccionan con el ADN y el ARN, posiblemente por esterificación de los grupos fosfatos o por reacción con el anillo nitrogenado de las purinas y pirimidinas [14].

Finalmente, está claro que los microorganismos pueden adaptarse a una gran variedad de condiciones físicas y químicas, es por ello que no es una sorpresa la resistencia que se reporta actualmente a los diferentes agentes químicos. Es de señalar la importancia que tiene, además, una correcta selección de los agentes químicos cuando se van a emplear frente a las células microbianas, lo cual se asocia con una mayor eficiencia en el uso de estos, siempre y cuando se roten para impedir que se generen mecanismos de resistencia que influyan sobre el modo de acción de los agentes químicos.

### Referencias Bibliográficas

- [1] Denyer, S.P.,1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior, Biodegrad* 36: 227-245
- [2] Klinger, B, 1995. Disinfectant testing on surfaces. : *J-Hosp-Infect.* 1995 Jun; 30 Suppl: 397-408
- [3] 8-Teixeira,P, 1996. Biosseguranca. Uma Abordagem Multidisciplinar.
- [4] Emori, T.G. & Gaynes,R.P.,1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*,
- [5] Hugo,H.B.,1982. Historical introduction. In: Russell, A.D., Hugo, H.B and Ayliffe, G.A. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell.,653 p.8-106
- [6] Block S.S, 1991. Historical review. In: Block,S.S. Disinfection, sterilization and preservation, 4th Ed Philadelphia: Lea & Febiger. 1162p. 3-17.
- [7] Kahrs RF, 1995. General disinfection guidelines.*Rev-Sci-Tech.* 1995 Mar; 14(1): 105-63
- [8] Wilson JD, 1995. Use of desinfectants in parenteral facilities. PDA, México
- [9] Jeffrey DJ, 1995. Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. *Rev-Sci-Tech.* 1995 Mar; 14(1): 57-74
- [10] Russell, A.D., 1982. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. In: Russell, A.D., Hugo, H.B. and Ayliffe, G.A.J. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell. 653p.107-133
- [11] Rutala, W.A., 1987. Disinfection, sterilization and waste disposal. In: Wenzel R.P. Prevention and control of nosocomial infections. Baltimore: Williams & Wilkins.641 p.247-282.
- [12] Prince, H.N.,1983. Disinfectant activity against bacteria and viruses: a hospital guide. *Particulate & Microbial Control* Mar/Apr.
- [13] Favero, M.S & Bond, 1991. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block, S.S Disinfection, sterilization and preservation. 4th Ed Philadelphia: Lea & Febiger. 1162p. 617-64.
- [14] Gardner, J.F & Peel, M.M.,1991. Introduction to sterilization, disinfection and infection control. 2ed. Melbourne: Churchill Livingstone, 264 p.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

## MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PREPARACIONES COMERCIALES DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

Lic. Natacha Reyes, Dra. Diadelis Remírez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

### Resumen

La obtención y comercialización de la EPO humana recombinante (rhEPO) con fines clínicos son llevadas a cabo por muchos centros biotecnológicos en el mundo. Esta ha sido considerada como uno de los productos de la Biotecnología que ha revolucionado esta industria. Los estudios reconocen que el tipo de línea celular huésped usada para la producción de rhEPO, las condiciones de cultivo y los procesos de purificación aplicados pueden todos afectar el perfil de glicosilación de las preparaciones y por tanto influenciar en la biopotencia final. Ensayos de evaluación de la actividad biológica son parte de la rutina de la liberación de lotes de las glicoproteínas terapéuticas. En este trabajo se hace una revisión de los diferentes métodos descritos para la evaluación de potencia de preparaciones de rhEPO relacionando las ventajas y desventajas reportadas de la aplicación en cada caso. Se evidencia un continuo análisis y mejoramiento de los métodos establecidos hasta el momento así como la introducción de nuevos bioensayos para rhEPO.

**Palabras claves:** eritropoyetina, ensayos de potencia, glicoproteína terapéutica.

### Introducción

La Eritropoyetina (EPO), es el principal regulador de la eritropoyesis en mamíferos. Esta constituye una hormona sialoglicoproteica que contiene 165 aminoácidos que forman una cadena simple polipeptídica con 2 enlaces disulfuro intra-cadena (Cys<sup>7-161</sup> y Cys<sup>29-33</sup>) y 4 sitios de glicosilación, tres uniones N (Asn<sup>24</sup>, Asn<sup>38</sup> y Asn<sup>83</sup>) y una unión O (Ser<sup>126</sup>) glicosídicas [1,2].

La masa molecular de la EPO es de 30-34 kDa, de la cual cerca de 18 kDa corresponden a la cadena péptida. Por tanto, aproximadamente el 40% de la molécula de EPO está formada por

carbohidratos mayormente en la forma de complejos tipo glicanos [3] los que desempeñan un rol importante en la actividad biológica, la cual parece ser dependiente del número de residuos ácidos siálicos en la terminación de las cadenas de azúcar bi, tri y cuaternarias, siendo esta última forma isomérica predominante en su estructura. Se ha señalado que la pérdida de estos residuos resulta en un rápido aclaramiento de las moléculas de EPO en el hígado [4-7].

La EPO es sintetizada en el hombre fundamentalmente en el riñón, en las células endoteliales de la corteza renal y de la médula externa. Liberada en sangre, se pone en contacto con su receptor específico en células precursoras a nivel del bazo y de la médula ósea, fundamentalmente eritroides, aunque también ha sido descrita su acción sobre los megacariocitos [8-12]. Al interactuar, inicia una compleja cascada de señales de transducción, la que puede ser inducida incluso en ausencia del ligando, en presencia de una forma mutada del receptor (por ejemplo reemplazo de cisteína en el dominio extracelular) [13,14]. Además, puede actuar como segundo mensajero e internalizarse. Diferentes estudios muestran su capacidad de incrementar notablemente los niveles de calcio intracelular [15].

En la expansión/maduración de estas células precursoras *in vivo*, están involucrados otros componentes (citoquinas), tales como IL-13 y GM-CSF [16,17]. Con el empleo de líneas celulares

de eritroleucemia o eritroblastos inmortalizados, se ha demostrado que la EPO puede inducir señales, tanto hacia la proliferación, como a la diferenciación [18-20]. En el estadio de maduración tiene lugar un aumento de la hemoglobinización y una aceleración de la maduración de los eritroblastos, así como un aumento de los reticulocitos, precursores directos de los eritrocitos.

La producción endógena de EPO normalmente es regulada por el nivel de oxigenación de los tejidos. La hipoxia y la anemia generalmente incrementan su producción con lo cual se estimula la eritropoyesis. En sujetos normales los niveles plasmáticos oscilan en el rango de 0.001 a 0.003 u/mL y se puede incrementar hasta 1000 veces durante periodos de hipoxia o anemia. En cambio en pacientes con insuficiencia renal crónica la producción de esta es deficiente y esta deficiencia es la causa primaria de la anemia [21].

La obtención y comercialización de la EPO humana recombinante (rhEPO) con fines clínicos es llevada a cabo por muchos centros biotecnológicos en el mundo. Esta ha sido considerada como uno de los productos de la Biotecnología que ha revolucionado esta industria. Aunque la rhEPO tiene varios años en el mercado internacional, y ha sido reconocido como un producto con novedad terapéutica de carácter excepcional, la posibilidad de acceso al mismo, en Cuba, estuvo limitada por la necesidad de su importación, por ser un medicamento de alta tecnología, y además porque los productores originales fundamentales son de origen norteamericano.

El EPOCIM y el HEBERITRO, ambas preparaciones farmacéuticas de rhEPO producidas en Cuba, han sido registradas

desde 1998 y principios de este año respectivamente en el CECMED. El EPOCIM ha sido registrado hasta el 2003 en Irán, Chile, Jamaica, R. Dominicana, El Salvador, Colombia, Brasil y Ecuador.

La rhEPO es indicada en el tratamiento de anemia como resultado de la reducción en la producción de EPO endógena en la insuficiencia renal crónica, incluyendo los pacientes en diálisis. Además, en pacientes con SIDA, en régimen terapéutico con zidovudina y en pacientes oncológicos con tratamiento de quimioterapia (de localización no mieloide). Siendo indicada para elevar o mantener el nivel de eritrocitos en sangre que se manifiesta o expresa por el nivel de hematocrito o de hemoglobina, y por lo tanto, reducir el número de transfusiones necesarias en estos pacientes [21].

La producción de rhEPO en general se realiza, a través de la expresión del DNA en líneas celulares eucarióticas, fundamentalmente en células de ovario de Hamster chino (CHO), pero también se reporta en células de riñón de Hamster recién nacido y en líneas celulares de fibroblastos (C127).

Los reportes plantean que el material recombinante que se obtiene es homogéneo con respecto a la secuencia péptida de la EPO natural, pero heterogéneo con respecto a las porciones de carbohidratos. Lo que se ha evidenciado a través de los perfiles de glicosilación que difieren entre preparaciones [5,22]. Tales diferencias pueden ser debido a variaciones en la sialilación terminal, la cual puede resultar en diferentes actividades específicas. Sin embargo, la mayoría de los estudios con rhEPO han mostrado que sus efectos biológicos son equivalentes a los de la EPO natural [23-25].

No obstante, los trabajos reconocen que el tipo de línea celular huésped usada para la producción de rhEPO, las condiciones de cultivo y los procesos de purificación aplicados pueden todos afectar el perfil de glicosilación de las preparaciones y, por tanto, influenciar en la biopotencia final. Por consiguiente, es esencial que una metodología bien caracterizada sea aplicada para asegurar consistencia lote a lote entre los diferentes fabricantes con el fin de garantizar una alta calidad y eficacia terapéutica [26,27].

A través de este trabajo se hace una revisión de los diferentes métodos descritos para la evaluación de potencia de preparaciones de rhEPO relacionando las ventajas y desventajas reportadas de la aplicación en cada caso.

### **Desarrollo**

Las primeras determinaciones de potencia de rhEPO fueron realizadas en ratas y ratones normales a través del seguimiento de la variación del hematocrito, del volumen de eritrocitos sanguíneos y el número de reticulocitos [3,25].

El primer método implementado para la evaluación de actividad de formulaciones de rhEPO fue desarrollado en ratones policitémicos [28]. El principio básico del ensayo es la reducción casi total de la síntesis endógena de EPO en ratones, a través de la exposición previa a presión atmosférica reducida por espacio de 14 días. Tales ratones son entonces sujetos a la administración de diferentes concentraciones de rhEPO, estimulándose así el crecimiento eritroide. La actividad de la formulación es finalmente evaluada a través de la determinación de sus efectos en la estimulación de la incorporación de <sup>59</sup>Fe en los hematíes circulantes. Aunque este ensayo es normalmente sensible, preciso y específico, el procedimiento

tiene una serie de desventajas como el uso de sustancias radioactivas, lo que requiere condiciones especiales de personal y de laboratorio para su manipulación; además, se emplea un alto número de animales y el esquema de tratamiento es de larga duración, en el cual el animal es sometido a alto nivel de estrés.

Posteriormente, se desarrolló el ensayo en ratones normocitémicos, el cual de forma general es llevado a cabo en animales normales con simples [29-31] o múltiples inyecciones [32-34], y la actividad biológica es medida por la estimulación de la producción de reticulocitos [3, 32-34]. Los bioensayos, en particular que involucran una simple inyección en ratones normocitémicos, han sido ampliamente aplicados en estudios de estandarización y en la evaluación de potencia de preparaciones farmacéuticas [29, 31-35]. Sin embargo, aunque estos son usualmente robustos, algunos necesitan modificaciones con respecto a mejorar la variabilidad y exactitud de la respuesta, parámetros muy importantes a la hora de determinar la potencia de lotes comerciales de varias fuentes de rhEPO [29-30].

Un reporte reciente [36] muestra, al comparar el empleo de simples y múltiples inyecciones, que con una simple administración de rhEPO generalmente se requieren al menos dos ensayos para alcanzar los límites aceptables, mientras que el estudio con múltiples inyecciones mostró intervalos de confianza más bajos, mayor precisión y reproducibilidad con un único ensayo. Es importante señalar que el protocolo con aplicación de múltiples inyecciones, como consecuencia de la estimulación diaria, resulta en un alto conteo de reticulocitos, con una dosis total baja de rhEPO por animal.

Según la Farmacopea Europea [31], el empleo de ratones B6D2F1 de 8 semanas, es adecuado para el desarrollo del ensayo en ratones normocitémicos con una dosis única. Igualmente señala el uso de la citometría de flujo para el recuento de reticulocitos. Otros reportes [36, 37] plantean con buenos resultados, el uso de ratones hembras CF1 y BALB/c de 8 semanas con múltiples inyecciones, así como distintas variantes para el conteo no automatizado de reticulocitos.

#### ***Métodos para el conteo de reticulocitos***

El número de reticulocitos en circulación es un indicador temprano del estatus funcional de la eritropoyesis.

El contenido de RNA de los hematíes es directamente proporcional a la edad celular, siendo mayor en las células más jóvenes y ausente en la forma madura. Heilmeyer y Wethauser (1932) [38], clasificaron los reticulocitos en 4 estados (I, II, III y IV), reflejando el incremento de la madurez eritroide basado en el patrón de precipitación de RNA teñido con azul de metileno. Los reticulocitos son eritrocitos inmaduros que han perdido el núcleo, pero que contienen organelos residuales (es decir, ribosomas y mitocondrias), los cuales contienen ácido ribonucleico (RNA) y ácido desoxirribonucleico (DNA), aspecto que los hace fácilmente reconocibles por microscopía. [25, 33]. El conteo del número de reticulocitos resulta de gran valor en la clínica en el diagnóstico de la anemia.

Métodos manuales y automatizados han sido aplicados para la medición de reticulocitos en ratones tratados con rhEPO. El conteo visual usando tinciones supravitales tales como azul brillante de cresil (BSB), se ha reportado que puede tener amplia variabilidad intra-observador, que es de larga duración y frecuentemente

no confiable [39, 40]. No obstante, otros autores plantean que esta variación, puede minimizarse al realizar la lectura de tres láminas independientes del mismo animal. Este método es un aún ampliamente usado en laboratorios químicos clínicos.

Por otro lado, se reporta la hemólisis selectiva y el conteo de reticulocitos en cámara de Neubauer los cuales han mostrado correlación y resultados equivalentes al método automatizado [30, 40, 41]. Aunque la hemólisis, se ha señalado, también constituye una técnica muy larga y trabajosa necesiéndose dos o más ensayos independientes para alcanzar la precisión necesaria.

El método automatizado se ha desarrollado en procedimientos basados en la fluorescencia o absorbancia de colorantes (naranja de tiazol y azul de metileno respectivamente) que interactúan con el RNA del reticulocito. La precisión y exactitud del conteo han sido marcadamente desarrolladas, adicionándose numerosos parámetros a la investigación [40,42].

En el método estándar para el recuento de reticulocitos que utiliza el colorante vital Nuevo Azul de Metileno, las muestras de sangre se tiñen con este reactivo, se prepara un extendido y luego las células teñidas se cuentan con un microscopio de luz [43]. Sin embargo, este método es muy laborioso y está limitado por el error de muestreo estadístico inherente a un recuento de mil células. Cuando se emplean modificaciones del mismo, se ha reportado disminución aún más de la reproducibilidad [44].

La variabilidad que se reporta en general en el conteo manual de reticulocitos entre observadores y el reducido valor de células contadas, ha sido atribuido a inconsistencia en la clasificación de la mayor parte de los reticulocitos maduros

(Heilmeyer, IV estado), los cuales pueden contener solo un gránulo simple de reticulina [45]. La interpretación del conteo absoluto de reticulocitos se dificulta además, ya que el conteo total refleja no solo la proporción de producción de hematíes, sino también el cambio entre los diferentes estados del reticulocito.

En el individuo normal (no anémico), el reticulocito madura tres días en la médula ósea y se encuentra en la circulación periférica durante el cuarto día. El aumento de la eritropoyesis tiende a acelerar la maduración en la médula y alargar la duración de la maduración en la sangre. Los reticulocitos que tienen entre uno y tres días (reticulocitos de "transición"), pueden encontrarse en la sangre periférica y se cuentan como si fueran reticulocitos de cuatro días. Para hacer una estimación exacta de la eritropoyesis, hay que corregir el recuento por los reticulocitos de "transición" [46].

En años recientes, la citometría de flujo ha surgido como un método muy eficaz para el análisis y el conteo de células poblacionales individuales a través del tamaño, contenido y marcadores de superficie celulares. Ciertos colorantes fluorescentes unidos a RNA/DNA permiten la distinción de células como los reticulocitos [47]. Numerosos fluorocromos han sido empleados incluyendo pyronin [48], naranja de acridina [49] y thioflavin T [50], pero con limitaciones para su empleo clínico. Con la introducción del naranja de thiazole en 1986 [51], surgió un fluorocromo importante para el conteo de rutina de reticulocitos.

El empleo del kit Retic-Count™ para el conteo de reticulocitos en sangre periférica humana ha sido reportado. Retic-Count es el nombre comercial del 4-metilbecensulfonato de 1-metil-4[(3-metil-

2 (3H)-benzotiazolidin) metil quinolinio (Naranja de Tiazol), que es sintetizado por Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS) [52], el cual permite determinar los reticulocitos como un porcentaje de los eritrocitos totales en sangre periférica humana. El reactivo se une al RNA y el DNA, formando un complejo fluorescente de nucleótido-reactivo que muestra una banda de absorción a 475 nm (luz azul) y una banda de emisión fluorescente a 530 nm (luz verde), propiedad que permite su uso en los citómetros de flujo equipados con un láser a 488 nm, como es el caso de los citómetros de flujo FACS-Calibur, FACSort, FACScan y FACStrak. El uso de Retic-COUNT, se plantea que ofrece ventajas importantes, como es el conteo de diez veces más células, mejorando así la exactitud de la muestra estadística [53]. Un recuento típico requiere menos de un minuto al operador y las células que se cuentan están en suspensión, de manera que se eliminan los errores de distribución creados en las preparaciones de extendidos de sangre. Además, si se encuentra disponible en el equipo el uso del software Retic-Count, se ofrecen ventajas adicionales, ya que posibilita la reducción de la variabilidad debido al operador durante el análisis, al colocar marcadores automáticos, los resultados se calculan y se imprimen automáticamente y no se requiere del tubo de control incoloro. Estudios realizados por nuestro laboratorio (aún sin concluir), han evidenciado la posibilidad de aplicación de dicho kit en el conteo de reticulocitos en ratones tratados con rhEPO.

### **Métodos Alternativos**

Métodos alternativos para la evaluación de potencia de preparaciones de rhEPO son reportados en investigaciones recientes.

Estimados de actividad de rhEPO han sido realizadas usando cultivos de líneas celulares basadas en diferentes líneas incluyendo AS-E2, TF1, UT-7 y UT-7/EPO [54-56]. Un reporte del empleo de la línea celular TF1 (de eritroleucemia humana), para la determinación de la estimulación proliferativa inducida por lotes de rhEPO mostró correspondencia con la respuesta obtenida con la referencia empleada (material de referencia internacional de rhEPO, 87/684) y el análisis cuantitativo por Western [57]. Sin embargo, se plantea en general que estos ensayos *in vitro* son incapaces de discriminar entre la EPO intacta y sus variantes asialo-o aglicosadas, las cuales tienen un tiempo de vida media mucho más corto y, por tanto, una bioactividad muy reducida cuando son administradas *in vivo*.

Por otra parte, ha sido reportado recientemente el empleo de un método [58], mediante el cual se determina la carga hipotética de N-glicanos. La que se determina a través del cálculo de un número Z, según una expresión basada en los reportes obtenidos de la aplicación de una cromatografía de intercambio aniónico a pH alto con detección amperométrica (HPAEC-PAD) en la medición de N-glicanos previamente liberados de muestras de rhEPO [59-61].

El estudio plantea que cambios en los valores Z de muestras de rhEPO pueden ser paralelos a cambios en los respectivos patrones que se obtienen por isoelectroenfoque (IEF), los cuales reflejan la distribución de las glicofomas respecto a la carga de las muestras [60]. Sin embargo, los datos que se obtienen con IEF son menos significativos que la determinación de Z, dado que los cromatogramas HPAEC-PAD son capaces, además, de revelar cambios sutiles en las

estructuras N-glicosídicas, como son la ocurrencia de repeticiones o reemplazo. Por otra parte, variaciones en el contenido de ácido siálico, por ejemplo debido a la pérdida de residuos, son reflejados también en el valor de Z, siendo más ventajosa esta determinación dada su mayor precisión y exactitud. Además, cambios en las estructuras de carbohidratos sulfatados presentes en rhEPO, son reflejadas en el valor Z y en el cromatograma HPAEC-PAD, sin embargo, estos no se obtienen a través de la determinación de ácido siálico, por lo que el método ha mostrado que puede ser muy útil en el orden de garantizar consistencia lote a lote, para determinar el aclaramiento *in vivo* y predecir la bioeficacia de glicoproteínas terapéuticas [59,60].

Como se ha evidenciado, diferentes ensayos para la evaluación de la actividad biológica de preparaciones comerciales de rhEPO son aplicados como parte de la rutina de la liberación de lotes. La tendencia actual en el control de calidad de biológicos, es el desarrollo e implementación de métodos *in vitro*, como resultado de la mayor variabilidad, duración y costo de los ensayos en animales. Así como el uso de las pruebas de control de calidad en general, para monitorear la consistencia, más que para establecer la “verdadera” efectividad del producto, significando como consistencia de producción que un lote de producto sea de la misma calidad y se encuentre dentro de las especificaciones de un lote que ha demostrado ser seguro y eficaz en ensayos clínicos o en animales. Por lo que se mantiene un continuo análisis y mejoramiento de los métodos establecidos hasta el momento, así como la introducción de nuevos bioensayos para rhEPO.

## Referencias Bibliográficas

- [1] Wang FF, Kung CKH, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 1985; 116: 2286-2292.
- [2] Roberts D, Smith DJ. Erythropoietin: induction of synthesis to signal transduction. *Journal of Molecular Endocrinology* 1994; 12: 131-148.
- [3] Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography* 1996; 687: 189-199.
- [4] Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985; 116: 2293-2299.
- [5] Lai PH, Everett R, Wang FF. Structural characterization of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261: 3116-3121.
- [6] Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA. Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives. *Journal of Chromatography* 1991; 542: 459-471.
- [7] Takeuchi M, Kobata A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology* 1991; 1:337-346.
- [8] Erslev A. *Blood* 1953; 8:349-357.
- [9] Krantz SB, Gallien-Lartigue O, Goldwasser E. *J Biol Chem* 1963; 238:4085-4090.
- [10] McLeod DL, Shreeve MM, Axelrad AA. *Nature* 1976; 492-494.
- [11] Broudy VC, Lin N, Egrie J, De Haen C, Weiss T, Papayannopoulou T, Adamson JW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6513-6517.
- [12] Krantz SB. *Blood* 1991;77:419-434.
- [13] Lodish HF, Hilton DJ, Klingmuller U, Watowish SS, Wu H. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1995; 60:93-104.
- [14] Damen JE, Krystal G. *Exp Hematol* 1996; 24:1455-1459.
- [15] Huawei Q, Belanger A, Yoon H-WP, Bunn HF. Homodimerization restores biological activity to an inactive Erythropoietin Mutant. *J Biol Chem* 1998; 273:11173-11176.
- [16] Jones AL, Millar JL. *Baillier's Clin Haematol* 1989; 2:83-111.
- [17] Nocka K, Buck J, Levi E, Besmer P. *EMPO J* 1990; 91:3287-3294.
- [18] Broudy VC, Nakamoto B, Lin N, Payannopoulou T. *Blood* 1990; 75:1622-1626.
- [19] Tsuda H, Aso N, Sawada H, Hata T, Kawakita M, Mori KJ, Takatsuki K. *Int J Cell Cloning* 1991; 9: 123-133.
- [20] Steinlein P, Deiner E, Leutz A, Beug H. *Growth Factors* 1994; 10:1-16.
- [21] Cheung WK, Goon BL, Guilfoyle MC, Wacholtz MC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:412-423.
- [22] Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 2001; 98: 3626-3634.
- [23] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufmann RJ, Mufson A, et al Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313:806-810.
- [24] Lin F, Suggs S, Lin C. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1985; 82: 7580-7584.
- [25] Eder H, Roblenbroich B, Failing K A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. *Blut* 1989; 59:184-187.
- [26] Storring PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Stenning BE, Lamikanra A, Rafferty B, et al. Epoetin alpha and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *British Journal of Haematology* 1998; 100: 79-89.
- [27] Cifuentes A, Moreno-Arribas MV, Frutos M, Díez-Masa JC. Capillary isoelectric focusing of erythropoietin glycoforms and its comparison with flat-bed isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* 1999; 830: 453-463.
- [28] Cotes PM, Bangham DR. Bioassay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at reduced pressure. *Nature* 1961; 191:1065-1067.
- [29] Bristow A. III Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. *Pharmeuropa* 1997; 2: 31-47.
- [30] Albertengo ME, Valcarce GA, Oliva LM, Baiges DL, Alonso BS, Chiale CA. Eritropoyetina recombinante humana: método de valoración *in vivo* con ratones normocitémicos. *Sangre* 1999; 44: 357-363.
- [31] *European Pharmacopoeia* 2002. 4th edn. European Department for the Quality of Medicines, Strasbourg, France.
- [32] Kawamura A, Imai N, Kawaguchi T, Hayakawa T. Simple *in vivo* bioassay for erythropoietin. *British Journal of Haematology* 1991; 77: 424-430.
- [33] Hayakawa T, Wada M, Mizuno K, Abe S, Miyashita M, Ueda M. Simple *in vivo* bioassay

- without radioisotopes for recombinant human erythropoietins. *Biologicals* 1992; 20: 243-251.
- [34] Barbone AG, Aparicio B, Anderson DW, Natarajan J, Ritchie DM. Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1994;12:515-522.
- [35] Storring PL, Gaines Das RE. The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *Journal of Endocrinology* 1992. 134: 459-484.
- [36] Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36:1561-1569.
- [37] Committee for Standardization of Biologics of the People's Republic of China. Requirements for Biologics. Requirements for Recombinant Human Erythropoietin. 2000
- [38] Heilmeyer L, Westhauser R. Reifungsstadien an uberlebenden reticulocyten in vitro und ihre bedeutung fur die schatzung der hamoglobinproduktion in vivo. *Ztsch Kline Med* 1932; 121:361-379.
- [39] Lohmann RC, Crawford LN, Wood DE. Proficiency testing in reticulocyte counting. *Clinical and Laboratory Haematology* 1994; 16: 57-64.
- [40] Brugnara C. Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of hematological disorders. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 1998; 28: 1-11.
- [41] Rudensky B. Comparison of a semi-automated new coulter methylene blue method with fluorescence flow cytometry in reticulocyte counting. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1997; 57: 291-296.
- [42] Chang CC, Kass L. Clinical significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *American Journal of Clinical Pathology* 1997; 108:69-73.
- [43] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Proposed Standard: Method for reticulocyte counting (H16-P). Villanova PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- [44] Savage R, Skoog D, Rabinovich A..Analytical inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: A preliminary report from the College of American Pathologist Reticulocyte Project. *Blood Cells* 1985; 11:97-112.
- [45] Peebles DA, Hochberg A, Clark TD. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Path* 1981; 76: 713-717.
- [46] Miale J. *Laboratory Medicine Hematology* 5<sup>th</sup> ed. St Louis: C.V. Mosby,Co 1977.
- [47] Tanke HJ, Nieuwenhuis IAB, Koper GJM, Slats JCM, Ploem JS. Flow cytometry of human reticulocytes based on RNA fluorescence. *Cytometry* 1980; 5:313-320.
- [48] Chin-Yee I, FRCP(C) MD, Keeney M, Filmls Art, Lohmann C. Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. *Clin lab Haemat* 1991; 13: 177-188
- [49] Seligman PA, Allen RH, Kirchanski SJ, Natale PJ. Automated analyses of reticulocytes using fluorescent staining with both acridine orange and an immunofluorescence technique. *Am J Hematol* 1983; 14:57.
- [50] Sage BH, O'Connell JP, Mercolino TJ. A rapid vital staining procedure for flow cytometric analysis of human reticulocytes. *Cytometry* 1983; 4:222-227.
- [51] Lee L, Chen C, Chiu L. Thiazole Orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 1986; 7:508.
- [52] Ferguson D, Lee S-E, Gordon P. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Hematol* 1990; 33:13-17.
- [53] Kitamura T, Tojo A, Kuwaki T, Chiba S, Miyazono K, Urabe A, et al. Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line. *Blood* 1989; 73: 375-380.
- [54] Wen D, Boissel J, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 22839-22846.
- [55] Miyazaki Y, Kuryama K, Higuchi H, Sohda H, Imai N, Saito M, et al. Establishment and characterization of a new erythropoietin-dependent acute myeloid leukaemia cell line, AS-E2. *Leukemia* 1997, 11: 1941-1949.
- [56] Qiu H, Belanger A, Yoon HP, Bunn HF. Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273: 11173-11176.
- [57] Hammerling Ulf, Kroon R, Wilhelmsen T, Sjodin L. In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an eythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent. *Journal of Pharmaceutical Biomed Analysis* 1996; 14: 1455-1469.
- [58] Hermentin P, Witzel R, Schwick-Wagner P, Blumrich M. N-Glycan Charge Assay-an

- Alternative for Potency Assays of Therapeutic Glycoproteins? *Dev Biol Basel Karger* 2002; 111:89-97.
- [59] Hermentin P, Witzel R, Kansy EJ, Diderrich G, Hoffmann D, Metzner H, et al. The hypothetical N-glycan charge: a number that characterizes protein glycosylation. *Glycobiology* 1996; 6:217-230.
- [60] Hermentin P, Witzel R. The hypothetical N-glycan charge: A number to characterize protein N-glycosylation. *Pharm Pharmacol Commun* 1999; 5:33-43.
- [61] Hermentin P, Witzel R, Vliegenthart JFG, Kamerling JP, Nimitz M, Conradt HS. A strategy for the mapping of N-glycans by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal Biochem* 1992; 203:281-289.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

## **CONSIDERACIONES PARA LA EJECUCIÓN DE LAS AUDITORÍAS DE LA CALIDAD EN INSTITUCIONES DE SALUD**

Dr. Milo Oliver Blanco, Dr. Jesús Saiz Sánchez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública, MINSAP

### **Resumen**

Este trabajo hace una reseña de la experiencia acumulada para la ejecución de las Auditorías de la Calidad como herramienta de gestión y evaluación de la conformidad y por ende como método para identificar fallas en las instituciones de Salud, que permita que se tomen las medidas correctivas necesarias para mejorar continuamente la calidad de los productos y servicios que recibe la población cubana en dichas instituciones, lo cual es un objetivo supremo del Ministerio de Salud Pública.

**Palabras Claves:** Calidad, Auditorías de la Calidad.

### **Introducción**

Es parte de la estrategia actual de nuestro Ministerio la eliminación paulatina de los problemas existentes en las instituciones de salud del país, lograr el mejoramiento de la calidad de los productos tangibles y los servicios que se brindan, así como la preparación de estas para la implementación de Sistemas de Gestión de la Calidad, como un paso previo para alcanzar la excelencia.

Es conocido que la Auditoría de la Calidad es uno de los métodos que se pueden utilizar para buscar evidencias objetivas de fallas en cualquier institución de salud, ya sea de producción o de servicios.

Las series de Normas Internacionales ISO 9000, 9001, 9004 y 19011 ponen énfasis en la importancia de las Auditorías como una herramienta de gestión para el seguimiento y la verificación de la implementación eficaz de una política de una organización para la gestión de la calidad y/o ambiental.

Las Auditorías son también una parte esencial de las actividades de evaluación de la conformidad, tal como la certificación/registro, y de la evaluación y vigilancia de la cadena de suministro.

Este documento proporciona orientación breve sobre la gestión de los programas de Auditoría, en particular la realización de Auditorías a instituciones de salud de producción ó servicios, tengan ó no implementado un sistema de gestión de la calidad, así como sobre la competencia que deben tener los auditores y los métodos para recopilar información y procedimientos a llevar a cabo.

Se acompaña de los requisitos esenciales para una guía para realizar un diagnóstico de situación en cualquier institución.

### **Desarrollo**

#### ***I. Definiciones***

**Auditoría de calidad.** Proceso sistemático, independiente y documentado para obtener evidencias de las actividades, procesos y los resultados de una institución de salud y evaluarlos de manera objetiva, con el fin de determinar la extensión en que cumplen las disposiciones ó requisitos previamente establecidos y definidos en los criterios de auditoría.

**Criterios de auditoría.** Conjunto de políticas, procedimientos o requisitos.

**Evidencia de la auditoría.** Registros, declaraciones de hechos o cualquier otra información que son pertinentes para los

criterios de auditoría y que son verificables. Los criterios de auditoría se utilizan como una referencia frente a los cuales se compara la evidencia de la auditoría, pudiendo ser esta cualitativa o cuantitativa.

**Auditor.** Persona con la competencia para llevar a cabo una auditoría.

**Programa de auditoría.** Conjunto de una o más auditorías planificadas para un periodo de tiempo determinado y dirigidas hacia un propósito específico.

**Plan de auditoría.** Descripción de las actividades y de los detalles acordados de una auditoría.

**Competencia.** Atributos personales y aptitud demostrada para aplicar conocimientos y habilidades.

## ***II. Principios***

**Independencia.** Los auditores son independientes de la actividad que es auditada y están libres de sesgo y conflicto de intereses. Los auditores mantienen una actitud objetiva a lo largo del proceso de auditoría.

**Enfoque basado en la evidencia.** La evidencia de la auditoría es verificable. Está basada en muestras de la información disponible, ya que una auditoría se lleva a cabo durante un período de tiempo delimitado y con recursos finitos.

## ***III. Propósito***

Identificar a través de evidencias objetivas los problemas existentes en las instituciones de salud que permitan tomar acciones correctivas para mejorar la calidad de los productos tangibles y ó los servicios que se brindan.

## ***IV. Objetivos***

- Identificar fallas en la organización de los procesos de la producción y los servicios.

- Identificar incumplimientos de regulaciones existentes, procedimientos específicos y normas durante el desarrollo de los procesos de producción y/o de la prestación de los servicios.
- Identificar necesidades de acciones correctivas y preventivas.
- Identificar oportunidades de mejora del desempeño institucional.

## ***V. Alcance***

El proceso de Auditoría puede abarcar a tantas instituciones de salud del país como se considere necesario.

## ***VI. Tipo***

Esta auditoría puede ser realizada por segundas o terceras partes, por lo que es considerada una auditoría externa para las instituciones de salud.

La de segunda parte es la que se lleva a cabo por partes que tienen un interés en la organización, tal como los clientes, o por otras personas en su nombre.

La de tercera parte se llevan a cabo por organizaciones auditoras independientes y externas, tales como aquellas que proporcionan el registro o la certificación de conformidad de acuerdo con los requisitos de las Normas ISO 9001 o ISO 14001.

## ***VII. Personal que las debe realizar***

Estas Auditorías deben ser realizadas con personal especializado, el cual debe ser seleccionado por la parte que tiene el interés de realizar la auditoría entre los profesionales de experiencia del SNS, siempre que cumplan las condiciones especificadas para ser auditores. Este personal debe ser previamente capacitado. Los especialistas seleccionados para realizar la Auditoría conformarán equipos, en los cuales uno de ellos será el auditor líder, los que cumplirán las visitas

programadas a las unidades definidas y contempladas en el programa de auditorías de que se trate.

***VIII. Condiciones que deben reunir los especialistas seleccionados para integrar los equipos de Auditoría de la Calidad***

- Ser especialistas con 8 años o más de experiencia laboral como mínimo desde su graduación de cualquier especialidad. En el caso de que se vaya a realizar auditoría de servicios médicos, se recomienda que sean médicos que tengan 15 ó más años de experiencia a partir de su graduación, pudiendo ser de cualquier especialidad, aunque deben ser preferentemente especialistas en especialidades de Ciencias de la Salud.
- Para servicios médicos tener preferentemente categoría docente.
- Tener reconocido prestigio y autoridad técnica en el centro donde laboran.
- Poseer alguna experiencia en actividades de evaluación.
- Disponer del tiempo necesario para realizar las Auditoría Médica de la Calidad planificada.
- Tener interés personal de realizar la actividad con la calidad requerida, previa capacitación.
- No haber tenido sanciones laborales en el ejercicio de su profesión.
- Cumplir con algunos atributos personales: Ético, diplomático, observador, perceptivo, tenaz, íntegro, decidido y seguro de sí mismo, inquisitivo, amigable pero profesional, comunicativo y sin temores a ser auditor.

***IX. Los procedimientos del programa de auditoría deberían tratar lo siguiente:***

- La planificación y elaboración del calendario de las Auditorías.
- El aseguramiento de la competencia de los auditores y de los líderes de los equipos auditores.
- La selección de los equipos auditores apropiados y la asignación de sus funciones y responsabilidades (preparación de la Lista de Verificación y otras).
- La realización de las Auditorías, que conlleva:
  - revisión documental de protocolos, reglamentos, normas, referencias legales o de autoridad para soporte de procesos y actividades y otras;
  - revisión de procesos;
  - entrevistas con el personal directivo;
  - entrevistas con el personal médico y paramédico;
  - entrevistas con proveedores por factibilidad y muestreo simple aleatorio;
  - entrevistas a clientes externos e internos al azar;
  - reuniones del equipo auditor.
- Reunión de Clausura.
- Preparación, aprobación y distribución del informe de la auditoría (Informe cuantitativo de diagnóstico, tablas y anexos según sea necesario).
- La realización del seguimiento de la auditoría, si es aplicable.
- La conservación de los registros del programa de auditoría.
- La comunicación de los logros globales del programa de auditoría a los directivos que corresponda.

**Requisitos esenciales para una Guía de Diagnóstico de Situación en una Unidad de Salud**

Un momento básico en la realización de una Auditoría de Calidad en una Unidad de Salud es el Diagnóstico de Situación, para lo cual debe prepararse una lista de verificación.

De acuerdo a lo anterior, se presentan a continuación los Requisitos esenciales objeto de valoración para una Guía de Diagnóstico de Situación, que sirva para preparar la lista de verificación en una Unidad de Salud, en relación con la perspectiva de implementación o la tenencia ya de un Sistema de Gestión de la Calidad por Normas ISO 9001: 2000.

1. Que el sistema de gestión o las acciones de trabajo por la Calidad estén basadas en el enfoque de procesos. Cuáles procesos están identificados, secuencia e interacciones de estos, eficacia de las operaciones y control, recursos disponibles, si se realiza seguimiento, medición y análisis así como las acciones para alcanzar los resultados planificados y la mejora continua de los mismos. (Ver mapa de procesos y realizar revisión detallada de los procesos in situ).
2. La existencia de la documentación de la Calidad, incluyendo los procedimientos documentados y los registros establecidos y que ambos se cumplen y utilizan como se refiere.
3. El compromiso de la alta dirección con el desarrollo, implementación y mejora continua de la eficacia del Sistema Gestión de la Calidad declarados expresamente. (Ver Política y Objetivos de Calidad).
4. Que se determinan y se cumplen los requisitos del cliente.
5. Que la política es comunicada y entendida por la organización y si se revisa.
6. La realización de la planificación para la calidad. (ver planificación de la producción ó los servicios que se realiza)
7. Que las responsabilidades y autoridades están definidas, y se comunican dentro de la organización.
8. La designación del representante de la dirección (ver si está por escrito), y si este tiene responsabilidades establecidas y las cumple.
9. Si están establecidos los procesos de comunicación apropiados y si son eficaces (despachos, reuniones, información entre la Dirección y los distintos niveles de la organización y en particular con los trabajadores).
10. La realización de las revisiones del sistema de gestión de la calidad por la dirección y la verificación que se hace con los resultados de estas (qué se hace y cómo se hace).
11. Si la organización determina y proporciona los recursos necesarios para implementar y mantener sistemas de gestión de la calidad, así como aumenta la satisfacción del cliente.
12. Si la organización determina la competencia de sus recursos humanos (ver condiciones que deben reunir los cargos, si están definidas por escrito y si se cumplen), y si mantiene control de la formación y educación permanente de estos.
13. Si la organización define, proporciona y mantiene la infraestructura necesaria para lograr las conformidades con el servicio y si se define y gestiona el ambiente de trabajo.
14. Si se cumplen los requisitos determinados en el sistema de gestión de la calidad de la organización para la realización del servicio.

15. Si los productos adquiridos por la organización cumplen los requisitos especificados y si se evalúan y seleccionan los proveedores, analizando los criterios que se siguen.
16. Si la prestación del servicio por la organización se lleva a cabo bajo condiciones controladas y si esta válida los procesos de prestación del servicio que no pueden verificarse, mediante actividades de seguimiento y medición posteriores (validación x competencia e indicadores de resultados).
17. Si la organización protege y salvaguarda los bienes del cliente (cualquier bien que sea propiedad del cliente, ej. muestras de sangre, orina, exámenes de imagenología y otros).
18. La existencia de control de los dispositivos de seguimiento y medición y conformidad con los servicios prestados con relación a los requisitos establecidos (calibración y mantenimiento a intervalos planificados de equipos de medición).
19. La planificación e implementación de los procesos de seguimiento, medición, análisis y mejora por parte de la organización, que incluye la satisfacción del cliente, las Auditorías internas y el seguimiento y medición de los procesos y el producto.
20. El control del servicio no conforme y cómo este se realiza (existencia de procedimiento documentado).
21. Si la organización determina, recopila y analiza los datos apropiados para demostrar la idoneidad y eficacia del sistema de calidad (datos de satisfacción del cliente, conformidad con los requisitos del producto, tendencias de procesos y productos y los proveedores).
22. Si la organización mejora continuamente la eficacia del sistema de gestión de la calidad, valorar política y objetivos de la calidad, resultados de auditorías, acciones correctivas y preventivas.

### Bibliografía consultada

- [1] Saiz, J. Uso de la Clasificación Internacional del Funcionamiento, la Discapacidad y la Salud de la OMS en la evaluación e impacto de la calidad en los Servicios de Salud. Folleto docente de la ENSAP, Ciudad Habana, Cuba Julio del 2004
- [2] Narey Ramos B, Control de calidad de la atención de la salud, 2004.
- [3] Dpto. de Inspección Estatal, Oficina Provincial de Normalización, Curso de Auditoría Interna de Calidad Normas de la Serie ISO 9000, 1992.
- [4] Norma ISO 19011, Directrices para la Auditoría de los Sistemas de Gestión de la Calidad y o Ambiental, 2002.
- [5] Norma ISO 9001-2000, Sistemas de Gestión de la Calidad-Requisitos, 2000.
- [6] Norma ISO 9000-2000, Sistemas de Gestión de la Calidad-Fundamentos y Vocabulario, 2000.
- [7] Oliver M, Lista de Verificación para la Auditoría de la CEMAC, 2005.
- [8] IRAM, Guía para la interpretación de la Norma ISO 9001-2000 en organizaciones de salud, 2003.

## **EVALUACIÓN ECONÓMICA DE TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LA INSUFICIENCIA CARDIACA EN CUBA**

Lic. Manuel Collazo Herrera (cinfa@infomed.sld.cu)<sup>1</sup>, Dr. David García Barreto<sup>2</sup>, Dra. Damaris Hernández Veliz<sup>2</sup>, Dr. Helmer Torres Diez<sup>3</sup>, Dr. Ricardo Campos Muñoz<sup>3</sup>, Dr. Luis R. Suárez Fleites<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), MINSAP

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular (ICCCV), MINSAP

<sup>3</sup>Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras"

### **Resumen**

Este artículo tiene como objetivo fundamental, dar a conocer la aplicabilidad que puede tener la farmacoeconomía en la prestación de servicios sanitarios, para mejorar los niveles de eficiencia y racionalidad en la utilización de los medicamentos en Cuba. Se expone desde el punto de vista práctico y metodológico, una evaluación farmacoeconómica de tratamientos farmacológicos para la insuficiencia cardiaca congestiva crónica, según información retrospectiva de referencias terapéuticas y por el criterio de expertos nacionales en esta especialidad médica.

Como resultado de este análisis, se realizó una selección de la farmacoterapia más eficientes (tanto monoterapia como asociaciones), que permitan obtener una utilización racional de los medicamentos, con mayor efectividad terapéutica y un menor costo en la estrategia del tratamiento para la mejoría clínica en la insuficiencia cardiaca; así como que tenga implícita una menor influencia de los efectos adversos sobre la salud de los pacientes. Como conclusión de esta evaluación, se determinó mediante el criterio de decisión farmacoeconómico, el orden de prioridad que deberán tener los fármacos desde el punto de vista técnico y económico para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca, y que se ajusten a las condiciones económico-financieras que atraviesa actualmente nuestro país.

**Palabras claves:** efectividad, uso racional, costo-efectividad, farmacoeconomía, costos.

### **Introducción**

La evaluación farmacoeconómica trata de la comparación entre distintos medicamentos y otros métodos de tratamientos con respecto a sus propiedades terapéuticas y a los costos de su utilización como métodos alternativos,

para la toma de decisiones en el sistema sanitario [1].

En nuestro país, se está comenzando a incorporar los criterios farmacoeconómicos en la planificación de la gestión en salud, mediante la realización de evaluaciones que permitan elaborar las políticas y estrategias farmacoterapéuticas, sobre la base de la efectividad reportada y los costos del tratamiento. Con estas premisas, a la farmacoeconomía le ha correspondido una función importante para lograr mejorar la eficiencia y el uso racional de los medicamentos [2].

Las enfermedades del sistema cardiovascular son las principales causas de muerte de la población a escala mundial. Dentro de estas, la insuficiencia cardiaca (IC) tiene un peso considerable en la morbi-mortalidad del adulto mayor de 50 años de edad. La población cubana está en franco proceso de envejecimiento, ya que casi el 23 % de los habitantes tienen más de 50 años, por lo que constituye un serio problema socio-económico para el Sistema Nacional de Salud [3].

Aunque no existen datos oficiales sobre la prevalencia de esta enfermedad en Cuba, se calculan que los casos anuales en el ámbito nacional podrían estar en el orden de los 130 000 pacientes/año [3]. La hipertensión arterial y la enfermedad coronaria son las causas más frecuentes de IC [4-5].

Se denomina insuficiencia cardiaca congestiva crónica (ICCC), a aquél síndrome en el cual el corazón es incapaz de mantener el gasto de irrigación necesario para poder irrigar los tejidos de la periferia del músculo cardíaco [6], siendo el propósito del tratamiento farmacológico, aumentar el gasto cardíaco y reducir el edema pulmonar y periférico [7-9].

El objetivo de este análisis es realizar una evaluación económica de tratamientos farmacológicos para la ICCC, mediante la relación existente entre los costos del tratamiento y la efectividad terapéutica reportada, para poder determinar los niveles de eficiencia posibles de alcanzar con la farmacoterapia. Este trabajo tiene un carácter práctico-metodológico y su aplicabilidad cubrirá una necesidad técnico-económica, para orientar la toma de decisiones en el Sistema de Salud.

### Métodos

Desde el punto de vista metodológico, se realizó una evaluación farmacoeconómica de los tratamientos farmacológicos para la ICCC, basada en informaciones retrospectivas sobre terapéuticas de referencias reportadas, y criterios de expertos de reconocido prestigio en el ámbito nacional, pertenecientes al Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular (ICCCV) y del Hospital C. Q. "Hermanos Ameijeiras" de Cuba. El desarrollo de este análisis consta de una primera parte, donde se valora la efectividad terapéutica reportada de los tratamientos, y una segunda parte, donde se estiman los costos directos más relevantes de la farmacoterapia.

En este sentido, uno de los elementos indispensables en la práctica clínica es el conocimiento de la efectividad o el grado en el que una determinada intervención,

procedimiento, o servicio sanitario puesto en práctica logra lo que pretende conseguir [10]. Se puede definir la efectividad como los efectos de un tratamiento farmacológico en las condiciones habituales de uso [11]. Para el tratamiento de la ICCC, la medida común en que se puede expresar la efectividad es el porcentaje de casos mejorados [12]. La mejoría clínica para los pacientes con ICCC viene dado por [4-6]:

- Desaparición de los signos clásicos de descompensación cardiaca izquierda, derecha, o global al examen físico del paciente.
- Mejoría de la capacidad funcional, demostrada por la realización de los exámenes complementarios (ergometría).
- La referencia subjetiva del paciente de que los síntomas del diagnóstico inicial han mejorado considerablemente con la administración del tratamiento farmacológico.

El segundo aspecto, es el análisis de los costos de los tratamientos farmacológicos, como:

- Precio unitario de importación de los medicamentos.
- Costo unitario de adquisición de los fármacos de producción nacional.

La base de cálculo que se utiliza para la estimación del costo de tratamiento es la multiplicación del costo unitario de adquisición del fármaco por la posología de la dosis usual diaria (mínima, media o máxima), y por el tiempo de duración de la farmacoterapia, para determinar el nivel de gastos y comparar los montos económicos diferenciales de cada una de las alternativas [13].

La evaluación económica se realizó mediante la técnica de análisis del costo-efectividad (ACE), que expresa la relación

existente entre los costos de los tratamientos y la efectividad de las alternativas, para de esta forma obtener la eficiencia [14] que se expresa por el indicador \$/caso mejorado. Se utiliza el análisis del costo efectividad medio (ACEM) que relaciona el cociente costo-efectividad de una opción de tratamiento y su comparación entre el costo por unidad de efectividad de las demás opciones de tratamiento [15].

Todos los medicamentos analizados no tienen los mismos efectos adversos. Los efectos adversos del medicamento, son las reacciones nocivas que se producen a dosis utilizadas normalmente en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades, por lo tanto pueden afectar el cumplimiento de un tratamiento por el paciente [10-16]. Estos se pueden clasificar en:

**Frecuencia y Gravedad (F. G).** La frecuencia es la cantidad de efectos adversos en unidad de tiempo y la gravedad es la alteración que provoca el efecto adverso sobre la calidad de vida o sobre la vida del paciente [16]. Se pueden clasificar en:

1. Raros y leves: No se detectan por el paciente.
2. Frecuentes y leves: Causan molestias, pero no ocasionan abandono del tratamiento ni requieren ser tratados.
3. Moderados y raros: Cuando ocurren requieren tratamiento sin urgencia y no requieren hospitalización, pueden necesitar eventualmente de la consulta de un médico.
4. Moderados frecuentes: Requieren consulta médica, son causa de abandono del tratamiento y ocasionalmente requieren de exámenes complementarios y hospitalización.

5. Graves raros: Ponen en peligro la vida y requieren de tratamientos de urgencia.

**Posibilidad Predictiva (P.P).** Es la probabilidad de riesgo en predecir con antelación que va a ocurrir el efecto adverso [10] por el médico tratante. Puede clasificarse en:

1. Mayor capacidad de predicción de los efectos adversos.
2. Capacidad predictiva intermedia
3. Efectos adversos impredecibles.

**Adherencia al Tratamiento (AT).** Es la probabilidad de cumplimentar un tratamiento en la forma indicada y durante el plazo de tiempo de su duración [16]. Puede clasificarse en:

1. Mucha adherencia al tratamiento.
2. Adherencia media al tratamiento.
3. Poca adherencia al tratamiento.

Para valorar los efectos adversos del tratamiento, se utilizaron las técnicas evaluativas a través del criterio de expertos. Se empleó un cuadro evaluativo para medir estos indicadores y se establece un orden de importancia que tienen las reacciones colaterales, asignándoles valores ponderados a cada uno de ellos, como son: frecuencia y gravedad (70 %), adherencia al tratamiento (20 %) y posibilidad predictiva (10 %). Los efectos adversos se valoran en la práctica clínica habitual de forma cualitativa, obteniendo distintas calificaciones de: Excelente, Muy Buena, Buena, Regular y Mala.

Para realizar un análisis integral técnico y económico del tratamiento, se utiliza el análisis de decisión farmacoeconómica. El análisis de decisión es una técnica utilizada para ayudar en la toma de decisiones bajo condiciones de incertidumbre, tal como puede ser la administración de un fármaco en pacientes [11]. En una evaluación económica, los

análisis de decisión se basan a menudo en la comparación de los indicadores que resumen los resultados de cada opción de tratamiento [17].

Los indicadores que se incorporan para el análisis de decisión son los siguientes:

- Análisis Costo-Efectividad
- Efectos Adversos de los Tratamientos

Para determinar el orden de prioridad en la elección de los distintos medicamentos, se acudió a una valoración cuantitativa y cualitativa de los indicadores mediante el criterio de expertos.

### Resultados

Los medicamentos más utilizados - según reportes de la literatura internacional [18-22] y por criterios de expertos - como tratamientos de monoterapia, son los que aparecen en la Tabla 1.

En el caso de los esquemas de dos medicamentos asociados; estos comprenden la utilización de un diurético combinado con un digital, ó con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA); así como también con un antagonista de la angiotensina II. También se puede establecer la asociación de tres fármacos, compuesto por un diurético, más un digital y un antagonista de la angiotensina II [19-20].

Las formas de presentación de estos fármacos, las dosis usuales diarias y el tiempo de duración de los tratamientos farmacológicos, se presentan también en la Tabla 1 [9, 18,20,21].

La efectividad de los tratamientos farmacológicos se puede medir por la acción que tienen los medicamentos para la mejoría clínica en la ICC [8, 23-27], los cuales se reflejan en la Tabla 2.

Se calcularon los costos de los tratamientos por paciente para el tiempo de duración de la terapia con la

administración del fármaco seleccionado, según se expresa en la Tabla 2.

Cuando el medicamento utilizado en los diferentes esquemas es de producción nacional, los costos de los tratamientos son más bajos con respecto a los de importación. Esto sucede con los fármacos diuréticos, digital (digoxina) y los IECA (captopril y enalapril); ya sea como monoterapia o en asociaciones de medicamentos. Todo lo contrario sucede con los fármacos lisinopril y el losartán, que son medicamentos importados o por donaciones.

Como monoterapia, el tratamiento con digoxina es el menos costoso como promedio anual por paciente (USD \$ 0.70/caso), con respecto a todos los medicamentos empleados. Le siguen en orden de importancia, los diuréticos - fundamentalmente la hidroclorotiazida y la furosemida - que los costos promedios anuales por pacientes, según dosis de posología indicada están por debajo de los USD \$ 6.0/caso; y entre los IECA, el captopril presenta un costo promedio anual inferior a USD \$ 6.0/caso, por debajo del importe medio que tiene el enalapril.

Las biterapias que presentan un mejor resultado en el costo promedio anual del tratamiento son: digoxina más un diurético (entre USD \$ 2.0 - 7.5/ paciente tratado), los IECA de producción nacional con un diurético (entre USD \$ 4.0 - 16.0 /caso); así como la triterapia de un IECA de producción nacional con la digoxina más un diurético (entre USD \$ 4.8 - 16.5 / paciente).

El resto de los tratamientos de monoterapia y en asociaciones con medicamentos extranjeros tienen elevados costos, debido a los altos precios de importación que tienen estos fármacos en el mercado mundial. Los resultados de la

evaluación farmacoeconómica se presentan también en la Tabla 2.

Entre las monoterapias, la digoxina tiene el mejor resultado en el análisis costo-efectividad medio (USD \$1.0/caso mejorado); de los diuréticos, la hidroclorotiacida tiene una eficiencia promedio anual que supera al resto de los otros fármacos en bajas dosis (USD \$ 4.50 /caso mejorado), y en dosis altas, la furosemida presenta una eficiencia promedio más favorable de \$12.98 USD/caso mejorado. De los IECA, el captopril tiene el mejor resultado en el análisis costo-efectividad medio según las dosis diarias de posología indicada (entre USD \$ 3.42 – 6.84 /caso mejorado), en comparación con la administración del enalapril (entre USD \$ 5.56 – 22.25/ caso mejorado).

Con respecto a las asociaciones de fármacos, la biterapia hidroclorotiazida + digoxina tiene una relación costo-efectividad medio de \$2.56/caso mejorado, que supera al resto de las combinaciones, y la asociación de hidroclorotiazida con captopril, tiene una eficiencia promedio de \$ 4.54/caso mejorado, siendo la más ventajosa con relación a las otras biterapias que utilizan a los demás diuréticos con los otros IECA (enalapril y lisinopril). En el caso de la politerapia de tres asociaciones de un digital + un diurético + un IECA, la triterapia digoxina con hidroclorotiazida más captopril presenta la mejor relación costo-efectividad medio con USD \$ 5.32/caso mejorado.

Los indicadores de los efectos adversos se valoran de forma cualitativa mediante el criterio de expertos, realizando una comparación entre los fármacos, como se expone en la Tabla 3.

En tal sentido, el mejor resultado como monoterapia lo presenta el losartán, con

una valoración cualitativa de excelente en todos los parámetros según reporta la literatura [28], seguido por los diuréticos, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y la digoxina. En las asociaciones de fármacos, los valores de los parámetros para medir la influencia de los efectos adversos fluctúan entre la calificación de muy buena y mala, en dependencia de la combinación de medicamentos.

El análisis farmacoeconómico indica la prioridad de las opciones para su utilización como esquema terapéutico general en el tratamiento de la ICC, tal como se muestra en la Tabla 4.

Estos resultados farmacoeconómicos, se pueden resumir en términos del orden de prioridad que debe tener el empleo del esquema de tratamiento, de la siguiente manera:

- Insuficiencia cardiaca congestiva crónica (de origen no isquémico)

Primera Opción: Digoxina

Segunda Opción: Digoxina + enalapril

Tercera Opción: Digoxina + enalapril + hidroclorotiazida

- Insuficiencia cardiaca congestiva crónica (de origen isquémico)

Primera Opción: Enalapril

Segunda Opción: Enalapril + hidroclorotiazida

Este análisis se corresponde a las condiciones reales que tiene la práctica clínica habitual de nuestro país, con los medicamentos de producción nacional que circulan en la actualidad en el mercado farmacéutico interno y se considerarán como elementos para la toma de decisión en el ámbito de la administración sanitaria, así como también para que el facultativo tratante tenga los criterios suficientes a la hora de la prescripción del tratamiento en los niveles de atención de salud, sin dejar

de considerar las contraindicaciones que tienen implícitos estos fármacos.

## Discusión

Según reporta la literatura, el tratamiento de la ICCC tiene como premisa fundamental aumentar el gasto cardíaco y reducir el edema pulmonar y periférico [6-7]. Tradicionalmente, el tratamiento de la insuficiencia crónica leve, ha incluido la limitación de la actividad física, restricción de la ingesta de sal y el uso de un diurético natriurético. Si estas medidas no son suficientes, clásicamente se agrega un digital (digoxina). Posteriormente si es necesario, se evalúa la utilización de los vasodilatadores o una enzima de la conversión de la angiotensina, para el tratamiento coronario de la ICCC junto con un diurético, digital o ambos [8, 29-30].

La digoxina se usa con dos fines, para restablecer una circulación adecuada en pacientes con ICCC, o para disminuir la frecuencia ventricular en pacientes con fibrilación o aleteo auricular. Su uso terapéutico más importante está indicado para la insuficiencia cardíaca no isquémica. Se plantea que del 5 al 20 % de los pacientes expuestos al tratamiento con digoxina tiene que abandonarlo por los efectos adversos; y de ellos del 1 al 4 % con una mayor intensidad [31-32].

Los diuréticos actúan disminuyendo el volumen sanguíneo, así como en la retención de líquido que ocurre en la IC [29-32]. A excepción de los medicamentos diuréticos que ahorran potasio como la espironolactona, los demás fármacos diuréticos aumentan la excreción de potasio; y por ende, este mecanismo provoca la intoxicación con digoxina. Las tiazidas son los diuréticos de elección en el tratamiento de edema, cuando ésta se debe a ICCC de leve a moderada (hidroclorotiazida, clortalidona). Generalmente, las contraindicaciones fundamentales para los diuréticos en los

pacientes son en casos de insuficiencias renales y / o hepáticas, así como en la diabetes mellitus.

Los IECA actúan vasodilatando y disminuyendo la resistencia vascular periférica, permitiendo al corazón, vaciar su contenido sanguíneo, o bombear con mayor facilidad. Son los únicos medicamentos que han logrado demostrar hasta el momento, un aumento significativo de la sobrevida de los pacientes con ICCC. Generalmente son los más tolerados y potencializan las acciones de los demás fármacos empleados en el tratamiento [23-25].

Aunque inicialmente indicados en pacientes inadecuadamente controlados con digoxina y diuréticos; ahora los inhibidores de la enzima de conversión se están usando en estadios más tempranos de descompensación cardíaca. Los IECA están indicados para la insuficiencia cardíaca isquémica y no isquémica; y han demostrado que son útiles para la ICCC.

Con relación a los efectos adversos de los IECA, se plantea que el 6 % de los pacientes están obligados a abandonar el tratamiento, por tener la función renal alterada. Estos efectos adversos tienen una mayor frecuencia de aparición en el caso del captopril con relación al enalapril [19, 20, 23].

Los inhibidores de la angiotensina II como el losartán fueron ensayados en IC en el estudio ELITE II, comparándose el efecto del losartán versus captopril sobre la mortalidad en pacientes, confirmando que el losartán es superior y mejor tolerado que el captopril. Se plantea que del 2 al 3 % de los casos tienen que suspender el tratamiento por los efectos adversos [27-28].

Como se ha expresado, la propuesta de selección deberá recaer en los medicamentos menos costosos, más

efectivos, y que reporten menor cantidad de efectos adversos sobre el paciente. En este sentido, el análisis farmacoeconómico conjugará los criterios técnicos, económicos y sociales en términos de salud, con respecto a la utilización de los fármacos, para poder orientar la toma de decisiones en la prestación de los servicios de salud, y definir las políticas y estrategias terapéuticas más racionales y eficientes para la mejoría clínica de los pacientes con ICC.

Por lo anteriormente expresado, se puede decir que la evaluación económica de los tratamientos para la ICC, demuestra la aplicación de esta útil herramienta de trabajo en la toma de decisiones sanitarias, y poder elaborar de esta manera, las políticas y estrategias para la utilización de los medicamentos, sobre la base de su efectividad clínica reportada y los costos de la farmacoterapia.

### Referencias Bibliográficas

- [1] Vernengo MJ. Control oficial de medicamentos. Washington D C: Organización Panamericana de la Salud; 1996.
- [2] Collazo M, Casademunt N. La farmacoeconomía en la industria farmacéutica y el sistema sanitario de Cuba. Rev Panam Salud Pública 2001; 10(4): 263-267.
- [3] Cuba. Ministerio de Salud Pública. Reportes de la Dirección Nacional de Estadísticas. La Habana, 2002.
- [4] McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: The Framingham study. N Engl J Med 1971; 285:1.441-1.446.
- [5] Cortina A, Fuster V. Insuficiencia cardíaca congestiva. Concepto, magnitud del problema e historia natural. En: Cortina A (editor). Insuficiencia cardíaca congestiva. Barcelona: Prous S.A., 1992; 9-18.
- [6] Francis GS, Cohn JN. Heart failure: mechanisms of cardiac and vascular dysfunction and the rationale for pharmacologic intervention [revision]. FASEB J 1990; 4: 3.068-3.075.
- [7] Guidelines for the diagnosis of heart failure. Eur Heart J. 1995;16 : 741-751
- [8] The Task Force of Working Group of Heart Failure of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 1997; 18:736-753.
- [9] ACC/AHA. Guidelines for the evaluation and management of heart failure. J Am Coll Cardiol. 1995; 26:1376-1398.
- [10] Baños JE, Brotons C, Farré M. Glosario de investigación clínica y epidemiológica. Barcelona. Fundación Dr. Antonio Esteve; 1998.
- [11] SOIKOS. Glosario de términos y conceptos de uso frecuente en la evaluación económica de medicamentos y programas sanitarios. Barcelona. Química Farmacéutica Bayer; 1996.
- [12] Badía X, Rovira J. Evaluación Económica de Medicamentos. Un instrumento para la toma de decisión práctica y la política sanitaria. Barcelona: Luzán S; 1994.
- [13] Lobato P, Lobo F, García A. Estrategia, viabilidad e implicaciones económicas de la atención farmacéutica. Madrid. Colegio Oficial de Farmacéuticos, 2000.
- [14] Drummond MF, Stoddart GL, Torrance GW. Métodos para la evaluación económica de los programas de atención de la salud. Editorial Díaz de Santos, Madrid, 1990.
- [15] Antoñanzas F. Evaluación económica aplicada a los medicamentos: características y metodología. En: Sacristán J, Badía X, Rovira J. (eds). Farmacoeconomía: evaluación económica de medicamentos. Editores Médicos, Madrid, 1995.
- [16] Arias T. Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso. Washington, D. C. Organización Panamericana de la Salud (OPS); 1999.
- [17] Rovira J. Temas controvertidos en la evaluación económica de tecnologías sanitarias. En: Sacristán J, Badía X, Rovira J. (eds). Farmacoeconomía: evaluación económica de medicamentos. Editores Médicos, Madrid, 1995.
- [18] Foster R.W. Basic Pharmacology. 4<sup>th</sup> ed. University of Manchester, UK. 1996; 122-125
- [19] Packer M, et al: Withdrawal of Digoxin from patients with chronic heart failure treated with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Engl J Med 329:1, 1993. Radiance Study.
- [20] Berger BE Warnock DG: Clinical uses and mechanisms of action of diuretic agents in Brenner BM, Rector FC (eds): Philadelphia, WB Saunders, 1986; 433.
- [21] R.W. Foster. Basic Pharmacology. 4<sup>th</sup> ed. University of Manchester, UK. 1996; 135-139.
- [22] R.W. Foster. Basic Pharmacology. 4<sup>th</sup> ed. University of Manchester, UK. 1996; 471.
- [23] SOLVD Investigators: Effect of Enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left

- ventricular ejection fractions. *N Engl J Med.* 1992;327: 685.
- [24] SOLVD Investigators: Effect of Enalapril on Survival in patients with reduced left ventricular ejections and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991;325;293.
- [25] Rector TS, Johnson G, Dunkman WB, Daniels G, Farrell L, Henrick A et al. Evaluation by patients with heart failure of the effects of Enalapril compared with Hidralazine plus isosorbide dinitrate on quality life V-HeFt II. *Circulation* 1993;87:VI-71-VI-77.
- [26] AIRE (Accurate Infarction Ramipril Efficacy) Investigators. 1993; *Lancet.* 342:821-828.
- [27] ELITE II (Effect of Losartan compared with Captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial-the Losartan Heart Failure Survival Study). *Lancet* 2000; 6;355(9215):1582-7.
- [28] Dina R, Jafari M. Angiotensin II-receptor antagonists: an overview. *Am J Health-Syst Pharm* 2000, 57(7): 1231-1241.
- [29] Hardman J, Limbird L, Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. 2. Novena edición. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, Ciudad de México, 1996.
- [30] Parfitt K. Martidale. The complete drug reference. 32 ed. Pharmaceutical Press; London, 1999.
- [31] Rosenstein E. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 47 edición. Editorial PLM; Ciudad de México, 2001.
- [32] Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Catalogo de especialidades farmacéuticas. Ediciones Informatizadas. Madrid, 2000.

**Tabla 1. Fármacos empleados en el Tratamiento de la Insuficiencia Cardíaca Congestiva Crónica.**

Fármacos / Presentación	Dosis Usual Diaria (mg/día)	Duración del Tratamiento	Observaciones
<b>Digitálicos</b>			
Digoxina tab. 0.25 mg	0.25	Años	Producción Nacional
<b>Diuréticos</b>			
Hidroclorotiacida tab. 25 mg	25 a 75	Años	Producción Nacional
Clortalidona tab. 50 mg	25 a 50	Años	Producción Nacional
Furosemida tab. 40 mg	40 a 80	Años	Producción Nacional
Espironolactona 25 mg	100	Años	Producción Nacional
<b>IECA</b>			
Enalapril tab. 10 mg	5 a 20	Años	Producción Nacional
Lisinopril tab. 10 mg	5 a 20	Años	Importado
Captopril tab. 25 mg	25 a 50	Años	Producción Nacional
<b>Antag. Angiotensina II</b>			
Losartán tab. 50 mg	50	Años	Importado

Fuentes: ACC/AHA [9], R.W. Foster. [18]

**Tabla 2. Efectividad, Costo Anual y Costo-Efectividad Medio del Tratamiento.**

Esquemas Tratamientos	Efectividad Terapéutica (% casos mejorados)	Costo Anual Tratamiento (\$ / caso)			Costo-Efectividad (\$ / caso mejorado)		
		Dosis Mínima	Dosis Única	Dosis Máxima	Dosis Mínima	Dosis Única	Dosis Máxima
Digoxina	70		0.70			1.00	
Hidroclorotiacida	30	1.35		4.05	4.50		13.50
Clortalidona	30	3.45		6.89	11.50		22.97
Furosemida	40	2.59		5.19	6.48		12.98
Espironolactona	20		26.83			134.14	
Enalapril	80	4.45		17.80	5.56		22.25
Lisinopril	80	50.04		200.14	62.55		250.18
Captopril	80	2.738		5.475	3.42		6.84
Losartán	80		282.88			353.59	
Digoxina + Hidroclorotiacida	80		2.05			2.56	
Digoxina + Clortalidona	80		4.15			5.19	
Digoxina + Furosemida	80		3.29			4.11	
Digoxina + Espironolac	80		7.41			9.26	
Enalapril + Hidroclorotiacida	90		10.25			11.39	
Lisinopril + Hidroclorotiacida	90		101.43			112.70	
Captopril + Hidroclorotiacida	90		4.09			4.54	
Enalapril + Clortalidona	90		12.35			13.72	
Lisinopril + Clortalidona	90		103.53			115.03	
Captopril + Clortalidona	90		6.19			6.88	
Enalapril + Furosemida	90		11.49			12.77	
Lisinopril + Furosemida	90		102.67			114.08	
Captopril + Furosemida	90		5.33			5.92	
Enalapril + Espironolactona	90		15.61			17.34	
Lisinopril + Espironolactona	90		106.79			118.65	
Captopril + Espironolactona	90		9.45			10.50	
Losartán + Hidroclorotiacida	90		284.23			315.81	
Losartán + Clortalidona	90		286.33			318.14	
Losartán + Furosemida	90		285.47			317.19	
Losartán + Espironolactona	90		309.71			344.12	
Digoxina + Hidroclor. + Enalapril	90		10.95			12.17	
Digoxina + Hidroclor. + Lisinopril	90		102.13			113.48	
Digoxina + Hidroclor. + Captopril	90		4.79			5.32	
Digoxina + Clortalid. + Enalapril.	90		13.05			14.50	
Digoxina + Clortalid. + Lisinopril	90		104.23			115.81	
Digoxina + Clortalid. +Captopril	90		6.89			7.65	
Digoxina + Furosem. + Enalapril	90		12.19			13.54	
Digoxina + Furosem. + Lisinopril	90		103.37			114.86	
Digoxina + Furosem. + Captopril	90		6.03			6.70	
Digoxina + Espironol. + Enalapril	90		16.30			18.12	
Digoxina + Espironol. + Lisinopril	90		107.49			119.43	
Digoxina + Espironol. + Captopril	90		10.15			11.28	
Digoxina + Hidroclor. + Losartán	90		284.93			316.59	
Digoxina + Clortalid. + Losartán	90		287.03			318.92	
Digoxina + Furosem. + Losartán	90		286.17			317.97	
Digoxina + Espironol. + Losartán	90		318.41			344.90	

Fuentes: The Task Force of Working Group of Heart Failure of the European Society of Cardiology [8], Unión Empresa QUIMEFA, MINBAS, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) y Criterio de Expertos, MINSAP

**Tabla 3. Efectos Adversos de los Tratamientos. Método Criterios de Expertos.**

Esquemas de tratamiento	Frecuencia y Gravedad	Posibilidad Predictiva	Adherencia Tratamiento	Resultado Final
Digoxina	Mala	Buena	Excelente	Regular
Hidroclorotiacida	Muy Buena	Excelente	Excelente	Muy Buena
Clortalidona	Muy Buena	Excelente	Excelente	Muy Buena
Furosemida	Regular	Buena	Excelente	Regular
Espironolactona	Muy Buena	Buena	Mala	Buena
Enalapril	Buena	Mala	Excelente	Buena
Lisinopril	Buena	Mala	Excelente	Buena
Captopril	Buena	Mala	Buena	Regular
Losartán	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Digoxina + Hidroclorotiacida	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Clortalidona	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Furosemida	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Espironolactona	Mala	Buena	Mala	Mala
Enalapril + Hidroclorotiacida	Buena	Mala	Excelente	Buena
Lisinopril + Hidroclorotiacida	Buena	Mala	Excelente	Buena
Captopril + Hidroclorotiacida	Buena	Mala	Buena	Regular
Enalapril + Clortalidona	Buena	Mala	Excelente	Buena
Lisinopril + Clortalidona	Buena	Mala	Excelente	Buena
Captopril + Clortalidona	Buena	Mala	Buena	Regular
Enalapril + Furosemida	Regular	Mala	Excelente	Regular
Lisinopril + Furosemida	Regular	Mala	Excelente	Regular
Captopril + Furosemida	Regular	Mala	Buena	Regular
Enalapril + Espironolactona	Buena	Mala	Mala	Regular
Lisinopril + Espironolactona	Buena	Mala	Mala	Regular
Captopril + Espironolactona	Buena	Mala	Mala	Regular
Losartán + Hidroclorotiacida	Muy Buena	Excelente	Excelente	Muy Buena
Losartán + Clortalidona	Muy Buena	Excelente	Excelente	Muy Buena
Losartán + Furosemida	Regular	Buena	Excelente	Regular
Losartán + Espironolactona	Muy Buena	Buena	Mala	Buena
Digoxina + Hidroclorotiacida + Enalapril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Hidroclorotiacida + Lisinopril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Hidroclorotiacida + Captopril	Mala	Mala	Buena	Mala
Digoxina + Clortalidona + Enalapril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Clortalidona + Lisinopril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Clortalidona + Captopril	Mala	Mala	Buena	Mala
Digoxina + Furosemida + Enalapril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Furosemida + Lisinopril	Mala	Mala	Excelente	Regular
Digoxina + Furosemida + Captopril	Mala	Mala	Buena	Mala
Digoxina + Espironolactona + Enalapril	Mala	Mala	Mala	Mala
Digoxina + Espironolactona + Lisinopril	Mala	Mala	Mala	Mala
Digoxina + Espironolactona + Captopril	Mala	Mala	Mala	Mala
Digoxina + Hidroclorotiacida + Losartán	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Clortalidona + Losartán	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Furosemida + Losartán	Mala	Buena	Excelente	Regular
Digoxina + Espironolactona + Losartán	Mala	Buena	Mala	Mala

Fuente: Criterios de Expertos; Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, MINSAP; Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos(CIDEM), MINSAP

**Tabla 4. Análisis de Decisión Farmacoeconómica para el Tratamiento de la ICC.**

Esquemas Tratamiento	Costo-Efect. Méedio (\$ / caso mejorado)	Calificación Efectos Adversos	Orden de Prioridad
<b>Monoterapia</b>			
Digoxina	1.00	Regular	(1) No isquémico
Hidroclorotiacida	9.00	Muy Buena	
Clortalidona	17.24	Muy Buena	(1) Isquémica. (2) No isquémico
Furosemida	9.73	Regular	
Espironolactona	134.14	Buena	
Enalapril	13.90	Buena	
Lisinopril	156.37	Buena	
Captopril	5.13	Regular	
Losartán	353.59	Excelente	
<b>Asociaciones de Fármacos</b>			
Digoxina + Hidroclorotiacida	2.56	Regular	(2) No isquémico
Digoxina + Clortalidona	5.19	Regular	
Digoxina + Furosemida	4.11	Regular	
Digoxina + Espironolactona	9.26	Regular	
Enalapril + Hidroclorotiacida	11.39	Buena	(2) Isquémica (3) No isquémico
Lisinopril + Hidroclorotiacida	112.70	Buena	
Captopril + Hidroclorotiacida	4.54	Regular	
Enalapril + Clortalidona	13.72	Buena	
Lisinopril + Clortalidona	115.03	Buena	
Captopril + Clortalidona	6.88	Regular	
Enalapril + Furosemida	12.77	Regular	
Lisinopril + Furosemida	114.08	Regular	
Captopril + Furosemida	5.92	Regular	
Enalapril + Espironolactona	17.34	Regular	
Lisinopril + Espironolactona	118.65	Regular	
Captopril + Espironolactona	10.50	Regular	
Losartán + Hidroclorotiacida	315.81	Muy Buena	
Losartán + Clortalidona	318.14	Muy Buena	
Losartán + Furosemida	317.19	Regular	
Losartán + Espironolactona	344.12	Buena	
Digoxina + Hidroclorotiacida + Enalapril	12.17	Regular	(3) No isquémico
Digoxina + Hidroclorotiacida + Lisinopril	113.48	Regular	
Digoxina + Hidroclorotiacida + Captopril	5.32	Mala	
Digoxina + Clortalidona + Enalapril	14.50	Regular	
Digoxina + Clortalidona + Lisinopril	115.81	Regular	
Digoxina + Clortalidona + Captopril	7.65	Mala	
Digoxina + Furosemida + Enalapril	13.54	Regular	
Digoxina + Furosemida + Lisinopril	114.86	Regular	
Digoxina + Furosemida + Captopril	6.70	Mala	
Digoxina + Espironolactona + Enalapril	18.12	Mala	
Digoxina + Espironolactona + Lisinopril	119.43	Mala	
Digoxina + Espironolactona + Captopril	11.28	Mala	
Digoxina + Hidroclorotiacida + Losartán	316.59	Regular	
Digoxina + Clortalidona + Losartán	318.92	Regular	
Digoxina + Furosemida + Losartán	317.97	Regular	
Digoxina + Espironolactona + Losartán	344.90	Mala	

Fuente: Criterio de Expertos, MINSAP.

## Investigación-Desarrollo

---

### *PREVALENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN BAÑOS DE ENJUAGUES DE ENDOSCOPIOS Y EFICIENCIA DE DESINFECTANTES DE USO HOSPITALARIO*

Lic. María de los Ángeles Ramos García<sup>1</sup>, Dra. Dolores Martínez Portillas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

<sup>2</sup>Hospital Clínico Quirúrgico Docente Calixto García

#### Resumen

Uno de los microorganismos patógenos oportunistas por excelencia, causante de numerosas infecciones intrahospitalarias es *Pseudomonas aeruginosa*. En este trabajo se presenta un estudio realizado en un servicio de salud de la capital durante dos meses, donde se analizaron un total de 81 muestras. Los objetivos que se trazaron para el desarrollo de éste, fueron: determinar la contaminación bacteriana en las aguas de enjuagues de endoscopios, aislar e identificar los microorganismos existentes en ellas, evaluar las prácticas de limpieza en función de los resultados y analizar la efectividad de los desinfectantes en uso, así como la introducción de un nuevo producto declarado para la desinfección y esterilización en frío de instrumental quirúrgico. Como metodología a seguir se realizaron colectas de muestras de aguas e hisopados del instrumental, los cuales se analizaron posteriormente, además, de efectuar cambios en el procedimiento de rutina empleado en el departamento de Endoscopia en cuanto a la limpieza del artigo semicrítico. Finalmente, como conclusiones del trabajo, se logró determinar que existían contaminantes presentes en las aguas de enjuagues, se aislaron e identificaron los microorganismos presentes en las mismas, además, se demostró la importancia de realizar prácticas adecuadas en la limpieza y desinfección del material quirúrgico con vistas a evitar el riesgo de adquirir infecciones nosocomiales y se alcanzó evaluar la eficacia de los desinfectantes empleados, tanto del que estaba en uso como del agente químico que se introdujo para comprobar su efectividad "in situ".

**Palabras claves:** endoscopios, desinfección, infecciones nosocomiales.

#### Introducción

La limpieza y desinfección son dos pasos necesarios e importantes para prevenir la transmisión de infección de paciente a paciente por endoscopios y sus accesorios. No hay evidencia de que una esterilidad completa sea necesaria, pero sí se recomienda la desinfección de alto nivel [1] para este tipo de material. Los endoscopios son usados ampliamente para el diagnóstico terapéutico de desórdenes en la salud. Todos los pacientes bajo estudios de endoscopia gastrointestinal deben ser considerados de riesgos por estar expuestos a infecciones por microorganismos resistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, virus de HIV, hepatitis B, C entre otros agentes patógenos [2]. Los procedimientos de limpieza y desinfección juegan un papel esencial, se reporta la existencia de programas de aseguramiento de la calidad en cuanto a vigilancia microbiológica que demostraron en dos años la contaminación de las superficies externas de gastroscopios en un 60.5% y de los canales internos en un 41.3%, las bacterias aisladas fueron organismos Gram negativos en particular especies de *Pseudomonas*, caracterizadas por ser bacilos ligeramente curvos de aproximadamente

entre 0.5-1.0 x 1.5-5.0  $\mu\text{m}$  de tamaño, células Gram negativas, cuya motilidad ocurre por uno o varios flagelos polares, aunque hay casos en que raramente son móviles, son aeróbicos, teniendo un metabolismo estrictamente del tipo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones, en algunos casos el nitrato puede ser usado también como aceptor, catalasa positiva, por lo general quimiorganotróficos [3], otros microorganismos como especies de *Staphylococcus* también se aislaron.

La *Pseudomonas aeruginosa* es el patógeno humano del género *Pseudomonas* que se aísla con mayor frecuencia, siendo una de las razones principales de mortalidad en pacientes con fibrosis quística, enfermedades neoplásicas y quemaduras severas, en algunos hospitales es la tercera causa más común de infecciones nosocomiales sobrepasado sólo por el *Staphylococcus aureus* y la *Escherichia coli* [4].

Se reporta que en los servicios de Endoscopia, los reservorios de agua de máquinas automáticas de lavado fueron frecuentemente contaminados por *Pseudomonas aeruginosa*, la desinfección de las máquinas de lavado y enjuagues con alcohol de los endoscopios después de aplicar los procedimientos estándares redujeron significativamente la contaminación bacteriana [5].

Aunque se hayan tomado medidas apropiadas en la limpieza y desinfección, la limpieza manual con detergente del instrumental y de sus canales es la parte más importante, el moco y la materia orgánica puede evitar la adecuada penetración de desinfectantes como aldehídos, glutaraldehídos al 2% y productos relacionados de primera línea [6]. Un tiempo de inmersión de al menos 10 minutos debe ser adoptado para el

glutaraldehído, suficiente para inactivar bacterias vegetativas y virus incluyendo HIV y virus de la hepatitis B (HBV), periodos de tiempo de contacto de 20 minutos o más son necesarios si se sospecha de infección por micobacterias, en el caso de esporas bacterianas se requiere de al menos 3 horas de inmersión en glutaraldehído [7]. Otros productos como el ácido peracético al 0.2%, el peróxido de hidrógeno al 7.5%, el ácido peracético 0.08% más 1% de peróxido de hidrógeno, el ortho-phthalaldehído al 0.55% son declarados por la FDA para el reproceso de endoscopios gastrointestinales. Cada producto tiene sus ventajas y desventajas y su selección está en dependencia de las necesidades considerando factores como compatibilidad, toxicidad, controles ambientales y costos [8]. Otros análisis demuestran que la efectividad de la desinfección en endoscopios flexibles ha sido evaluada, por ejemplo, en estudios realizados desde 1991 a 1994, 157 muestras fueron tomadas de equipos de endoscopios, inicialmente después del examen y desinfección, por consiguiente los endoscopios examinados fueron contaminados por microorganismos residentes del tracto respiratorio y digestivo pero también por bacterias como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus* las cuales son fuentes de severas infecciones [9].

La infección es uno de los daños del proceso endoscopio, es conocido ampliamente el riesgo recibido principalmente por infecciones potenciales con HIV. En pacientes individuales, los factores relacionados con el paciente (hospederos comprometidos) y los factores relacionados con los procedimientos (v.g. daños en los tejidos) determinan el riesgo de la infección [10]. Cualquier método de

ensayo de esterilización o desinfección de alto nivel pudiera fallar si la limpieza ha sido defectuosa. La profilaxis antibiótica es requerida para prevenir septicemias y endocarditis bacterianas asociadas en pacientes de alto riesgo. La prevención de serias infecciones clínicas asociadas a endoscopias requiere de un estricto cumplimiento de los protocolos de reproceso de los equipos y personal paramédico especialmente entrenado [11]. Los avances tecnológicos en los últimos 30 años han dado como resultado el desarrollo de complejos, sensibles y caros instrumentales médicos, incluyendo los endoscopios flexibles gastrointestinales. Si estos instrumentos no son apropiadamente limpiados y desinfectados su uso puede fallar e incrementar la posibilidad de transmisión de infecciones entre pacientes. Aunque los procesos de limpieza remueven la microflora intestinal, el proceso de enjuague en sí mismo introduce una flora microbiana saprofitica o ambiental [12].

El trabajo que se presenta fue llevado a acabo en una servicio de salud de la capital y los objetivos que se trazaron para el desarrollo del mismo fueron, determinar la contaminación bacteriana en las aguas de enjuagues de endoscopios, aislar e identificar los microorganismos existentes en ellas, evaluar las prácticas de limpieza en función de los resultados y analizar la efectividad de los desinfectantes en uso, así como la introducción de un nuevo producto declarado para la desinfección y esterilización en frío de instrumental quirúrgico

### **Métodos**

El estudio se llevó a cabo en un Hospital Clínico Quirúrgico de Ciudad de la Habana, por un periodo de dos meses, se

colectaron y procesaron un total de 81 muestras.

La ejecución del trabajo se dividió en dos fases, en la primera, las tomas de muestras así como la limpieza y desinfección del material en análisis se realizaron en las condiciones que tenía establecido el personal paramédico del Servicio de Endoscopia del Hospital, en la segunda fase se introdujeron cambios con respecto a la limpieza y desinfección del instrumental quirúrgico y se evaluó el uso de otro agente desinfectante en estudio.

Habitualmente el proceso de limpieza del instrumental se realiza en lavabos con cepillos y solución detergente para arrastrar la materia orgánica y posteriormente se enjuaga con agua dura. El material limpio se sumerge y pasa con ayuda de una pinza estéril por 3 bandejas de acero inoxidable, conteniendo 500 ml de agua destilada estéril (baños de enjuagues). El agua empleada en los enjuagues se cambia de 3 a 5 días.

Luego, el endoscopio y la vaina, las partes que tienen contacto directo con el tejido vivo, se sumergen en 2 probetas de 2 L que contienen la solución desinfectante en uso, en este caso se utilizó una solución de Sonacida (Glutaraldehído al 2%) por espacio de 30 minutos de inmersión del material en ella. Después de este tiempo el endoscopio y sus accesorios son utilizados por el personal médico.

La frecuencia de limpieza, lavado y desinfección del instrumental se repite tres veces al día por corresponderse a 3 la cantidad de pacientes que se atienden diariamente.

Como materiales empleados en la ejecución del trabajo se utilizaron equipos como, incubadora de 30-37°C MEMMERT, microscopio óptico OPTON, estereoscópio MILD, gabinete de seguridad biológica BHA-48, autoclave

GETINGE, materiales como placas petri, gradillas, hisopos estériles, pipetas de cristal de 1 mL, tubos 13 x100 mm, medios de cultivo de la Oxoid como, caldo corazón, agar Mac Conkey, agar SS, agar cetrimide, agar manitol salado y otros medios de cultivo para pruebas bioquímicas, así como reactivos para la tinción de Gram provenientes de la Empresa Finlay. Para la identificación bacteriana de los microorganismos a especies se utilizó el manual Bergeys 9na edición.

A continuación se describen los pasos seguidos para las colectas de las muestras y su procesamiento:

#### ***Primera Fase***

##### *Muestreo del agua de los baños de enjuague*

Del primer y último baño de enjuague con 500 mL de agua destilada para el lavado del endoscopio y sus accesorios, se tomó con pipeta estéril 1 mL de muestra de agua antes y después de la inmersión en las bandejas, las muestras se depositaron en tubos estériles. De las muestras de agua colectadas, se realizó siembra por estría a los medios diferenciales agar Mac Conkey, agar SS, agar Cetrimide y agar manitol salado, las placas se incubaron de 30 a 37°C por 24 horas. Se aislaron los microorganismos obtenidos y se evaluaron, realizando tinción de Gram y siembra en los medios de cultivo para identificación bioquímica.

##### *Muestreo de la solución desinfectante Sonacida*

De cada una de las dos probetas que contenían la solución desinfectante Sonacida, se tomó 1 mL de las soluciones antes y después de la inmersión del instrumental, se depositaron en tubos estériles y procesaron inmediatamente, por

siembra directa en placas petri con medios de cultivo agar Mac Conkey, agar SS, agar Cetrimide y agar manitol salado, las mismas se incubaron de 30 a 37°C por 24 horas y se procedió al aislamiento e identificación en caso que existiese evidencia de crecimiento microbiano.

#### ***Segunda Fase***

##### *Pasos incorporados a la limpieza del endoscopio y sus accesorios. Cambios introducidos en los baños de enjuague del endoscopio y sus accesorios*

En el proceso de limpieza del instrumental quirúrgico después del cepillado con solución detergente y enjuague con agua dura, se incorporó un último enjuague con agua destilada de todos los accesorios y del endoscopio con su vaina.

Las bandejas que contenían el agua de lavado donde se sumergía el instrumental quirúrgico se cambiaron, de paciente a paciente, diariamente, tres veces al día.

Se tomaron muestras de aguas de las bandejas y con hisopos estériles del material limpio y se sembraron en tubos con caldo corazón, incubándose los mismos de 30 a 37 °C por 24 horas. De los tubos con caldo corazón, se realizó siembra directa a los medios diferenciales agar Mac Conkey, agar SS, agar Cetrimide y agar manitol salado, las placas se incubaron de 30 a 37°C por 24 horas. Al terminar el periodo de incubación se interpretaron los resultados.

##### *Introducción de una nueva solución desinfectante.*

La solución desinfectante Sonacida se rotó por el desinfectante de endoscopios preparado (New Ger al 2%), las colectas y siembras de las muestras se realizaron de igual forma que en la primera fase del estudio explicado anteriormente.

## Resultados

Como resultado del muestreo del agua de los baños de enjuague se obtuvo que del total de 81 muestras recogidas, se analizaron el 100%, resultando que el 2.46% dieron contaminadas (2 placas), el 28.3% de las muestras (23) resultaron con crecimiento microbiano y 69.1% (56) muestras no tuvieron crecimiento.

En la Tabla 1, se reflejan los resultados de la identificación bioquímica de microorganismos aislados de los baños de enjuague.

En la primera fase del estudio correspondiente al muestreo del agua de los baños de enjuague, en la Tabla 2, se refleja el porcentaje de microorganismos aislados, de las muestras que resultaron positivas, 11 correspondieron ser aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, 4 de *Citrobacter freundii*, 3 aislamientos fueron de *Providencia alcaligenes*, 2 aislamientos de *Acinetobacter calcoaceticun*, y un aislamiento de *Hafnia alvei*, *Flavobacterium* y *Escherichia coli*. Con respecto a la solución desinfectante Sonacida al 2% los resultados arrojaron que no hubo crecimiento microbiano antes ni después de los 30 minutos de exposición de sumergir el material quirúrgico en las probetas con la solución del producto químico.

En la segunda fase del estudio se obtuvo que los hisopados realizados a todo el material después de la limpieza exhaustiva y el enjuague con agua destilada del endoscopio y sus accesorios, no hubo crecimiento microbiano alguno en los medios diferenciales que fueron sembrados, así como después de haber introducido el cambio de agua en los baños de enjuague entre cada paciente examinado y diariamente.

La evaluación que se realizó de la solución desinfectante New Ger a una

concentración del 2% arrojó resultados satisfactorios antes y después del contacto con el material quirúrgico durante el tiempo de exposición que fue de 30 minutos, no observándose crecimiento de microorganismos.

## Discusión

El primer resultado obtenido, muestra que realmente existe contaminación microbiana en los baños de enjuagues del instrumental quirúrgico, la posibilidad de encontrar carga biológica en estas aguas es real, debido a determinadas condiciones de infraestructura incluido el ambiente, el cual conspira contra un mejor servicio, aunque no es un área cuyas condiciones de instalación se clasifiquen como limpias, sino controladas, reflejándose en la Tabla 1, los microorganismos aislados, según las determinaciones realizadas para sus identificaciones bioquímicas hasta especie. Con respecto a los resultados alcanzados en la primera fase del estudio se refleja el porcentaje de microorganismos aislados en la Tabla 2, en cuanto al muestreo de los baños de enjuague antes de la inmersión, la presencia de estos contaminantes patógenos se debe por la frecuencia del cambio del agua en las bandejas, las cuales se mantenían por un periodo de 3 a 5 días con la misma calidad de agua debido a dificultades con la adquisición del agua destilada que debían transportar un gran número de frascos desde el Departamento de Microbiología, además, de no dar abasto para ambos servicios. Se observó, además, que el microorganismo de mayor incidencia fue la especie *Pseudomonas aeruginosa*, se conoce que éste se encuentra dentro de los tres microorganismos que producen un mayor número de enfermedades nosocomiales en

hospitales y es muy frecuente en pacientes inmunodeprimidos.

En relación con la presencia de contaminantes en el baño de enjuague después de la inmersión, se debió fundamentalmente a que no hubo un buen desempeño en el proceso de limpieza del endoscopio y sus accesorios, en general los pacientes que se enfrentan a este tipo de pruebas diagnósticas, sufren de patologías y están en un mayor grado expuestos a infecciones, es por ello que se requiere de un buen protocolo y procedimientos de limpieza y desinfección del instrumental entre cada caso.

En relación con el muestreo antes y después de la inmersión del instrumental en la solución desinfectante Sonacida a pesar de que para ésta el periodo de cambio del producto de las probetas sobrepasaba los 21 días en ocasiones evidenció, según los resultados obtenidos, un buen poder microbicida en el tiempo de exposición del material quirúrgico. Es sabido que este agente químico, a pesar de algunos inconvenientes, desde el punto de vista de ser irritante, es calificado como uno de los más usados para estos procedimientos quirúrgicos lo cual se refleja en el trabajo.

En la fase dos, donde arrojó como resultado que no se obtuviera crecimiento microbiano en las aguas de los baños de enjuague después de introducir el cambio a diario del agua destilada de las bandejas y entre cada paciente atendido, así como de las siembras que se realizaron del hisopado del endoscopio y sus accesorios, es síntoma de que es necesario considerar los procesos que hasta entonces se venían ejecutando con relación a la limpieza de los materiales en uso, así como de monitorear microbiológicamente y registrar los resultados de la limpieza con vistas a disminuir los niveles de

biocontaminación en los procedimientos de rutina, lo cual ayudaría enormemente a contribuir a la mejora del paciente sin riesgos de poder adquirir alguna infección extra por estos proceder.

Con relación al cambio del agente desinfectante Sonacida por el desinfectante New Ger al 2%, este último también demostró su elevada capacidad bactericida “in situ”, y se plantea así pues en estudios realizados retrospectivos fue evaluado “in vitro” y los resultados fueron satisfactorios, su introducción en este estudio fue para comprobar su efectividad como desinfectante y esterilizante en frío.

El estudio realizado, finalmente, permitió determinar el grado de contaminación presente en el agua de los baños de enjuague del endoscopio y sus accesorios; se determinó mediante el aislamiento e identificación por técnicas convencionales, que el microorganismo de mayor incidencia en los baños de enjuague resultó ser *Pseudomonas aeruginosa*, seguida de *Citrobacter freundii*, *Providencia alcaligenes*, *Acinetobacter calcoaceticum*, *Hafnia alvei*, *Flavobacterium* y *Escherichia coli*; se logró demostrar que una limpieza exhaustiva previo al proceso de desinfección redujo al máximo la contaminación bacteriana presente en el endoscopio y accesorios lo que contribuye a disminuir el riesgo de adquirir infecciones transmitidas por el instrumental quirúrgico. En cuanto a los desinfectantes empleados en la desinfección del endoscopio y los accesorios, el producto Sonacida al 2%, demostró ser eficaz frente a los microorganismos provenientes de los baños de enjuague y con respecto al producto New Ger, se pudo comprobar que está apto para el uso en la desinfección de alto nivel, según se requiere para las

prácticas de cirugía de acceso mínimo, debido a su buen poder bactericida y como recomendaciones podemos considerar que es necesario la revisión de los protocolos de limpieza y desinfección por el personal a cargo y mejorar en cuanto a la infraestructura, facilidades para la adquisición de agua destilada diaria, materiales de limpieza como hisopos en cantidad suficiente y personal que garantice la limpieza a diario.

### Referencias Bibliográficas

- [33] Tremain SC Prim Care 1995.Sep,22(3):471-8. Cleaning and disinfections of lower gastrointestinal endoscopes.
- [34] Kovacs BJ, Aprecio RM, Kettering, Chen YK. 1998. Efficacy of various disinfectants in killing a resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* by comparing zones of inhibition: implication for endoscopic equipment reprocessing.
- [35] Bergeys Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition.
- [36] Zinsser Microbiología.20a edición.
- [37] Merighi A, Contato E, Scagliarini R, Mirolo G, Tampieri. 1996. Gastrointest Endosc. May, 43(5): 522-4. Quality improvement in gastrointestinal endoscopy: microbiology surveillance of disinfection.
- [38] Gut. 1998. Cleaning and didinfection of equipment for gastrointestinal flexible endoscopy: interim recommendations of working Party of the British Society of Gastroenterology.
- [39] Ayliffe G. 2000.J.Hosp Inf Decontamination of minimally invasive surgical endoscopes and accessories.
- [40] Guideline for the use of high level-disinfectants and sterilants for reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. 2000 Gastroenterol Nurs Jul-Aug,23(4):180-7.
- [41] Dabrowiecki S, Waszak B. 1995. Przegł Epidemiol, 49(1-2), 65-71. Effectiveness of endoscopes disinfection process.
- [42] Leiss o, Niebel J, Exner M. 1995. Leber Magen Daim Sep, 25(5): 198-202 Risk of infection in endoscopy.
- [43] Cowen AE. 2001. Can J Gastroenterol May 15(5): 321-31. The clinical risk of infection associated with endoscopy.
- [44] Chu NS, Favero M. 2000. Gastrointest Endosc Clin, Apr,10(2):233-44. The microbial flora of the gastrointestinal tract and the cleaning of flexible endoscopes.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 12 de enero de 2005

Tabla 1. Identificación bioquímica de microorganismos aislados de los baños de enjuague.

Microorganismo	Pruebas	Resultados
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	Oxidasa	+
	Catalasa	+
	O-F	aerobio estricto
	Manitol	-
	Lactosa	-
	Urea	+
	Citrato	+
	Indol	+
	Movilidad	+
	Lisina descarboxilasa	-
	Ornitina descarboxilasa	-
	Arginina dihidrolasa	+
	Crecimiento a 42°C	+
	<i>Escherichia coli</i> *	Oxidasa
Catalasa		+
Manitol		+
Lactosa		+
Glucosa		+
SH <sub>2</sub>		-
Urea		-
Citrato		-
Indol		+
Movilidad		+
Lisina descarboxilasa		+
<i>Acinetobacter calcoaceticum</i> *	Oxidasa	-
	Catalasa	+
	Citrato	+
	Motilidad	-
<i>Citrobacter freundii</i> *	SH <sub>2</sub>	+
	Indol	-
	Inositol	-
	Esculina	-
	SH <sub>2</sub>	+
	Lactosa	-
	Urea	+
	Citrato	+
<i>Hafnia alvei</i> *	Oxidasa	-
	Catalasa	+
	Citrato	+
	Lactosa	-
	SH <sub>2</sub>	-
	Urea	-
	Indol	-
	Lisina	+
	V-P	+
<i>Providencia alcaligenes</i> *	SH <sub>2</sub>	-
	Indol	+
	Urea	-
	Citrato	+
<i>Flavobacterium sp</i> *	Oxidasa	+
	Catalasa	+
	Lactosa	+
	Manitol	+
	Citrato	-
	Urea	-

Resultados Tinción de Gram: Bacilos Gram negativos

**Tabla 2. Porcentaje de microorganismos aislados.**

Microorganismos	Porcentaje de aislamientos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.6
<i>Citrobacter freundii</i>	4.94
<i>Providencia alcalígenes</i>	3.70
<i>Acinetobacter calcoacéticun</i>	2.47
<i>Hafnia alvei</i>	1.23
<i>Flavobacterium sp</i>	1.23
<i>Escherichia coli</i>	1.23

## *DELIMITACIÓN ENTRE MEDICAMENTOS Y EQUIPOS MÉDICOS EN EL SISTEMA REGULADOR SANITARIO CUBANO*

Lic. Silvia Delgado Ribas<sup>1</sup>, Dra. C. Celeste A. Sánchez González<sup>2</sup>, Lic. Karina Marinonovna Alfonso Alfonso<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (CCEEM)

<sup>2</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

<sup>3</sup>Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC)

### Resumen

Se realizó una investigación que identificó la legislación y regulación existente para la distinción entre medicamentos y equipos y dispositivos médicos en Cuba y en el mundo; se caracterizó la brecha a cubrir en nuestro país y se diseñó una regulación para dar respuesta a las necesidades nacionales, la que fue aprobada y puesta en vigor por el Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública. En la misma, se establecieron las bases de la categorización, grupos de casos, ejemplos, los requisitos adicionales y las particularidades de la evaluación.

El fortalecimiento del sistema regulador sanitario cubano resultante de este trabajo favorece a fabricantes y comercializadores de estos productos, así como al trabajo integral y la eficiencia del CECMED y el CCEEM, redundando en beneficio de la sociedad con productos de comprobada calidad, seguridad y eficacia.

**Palabras claves:** Medicamento, equipo médico, categorización, regulación, elevado nivel tecnológico.

### Introducción

Desde comienzos de la década del 70 y condicionado por un acelerado desarrollo tecnológico, se reconoció la necesidad de una adecuada legislación para la regulación y el control sanitario de los equipos y dispositivos médicos en aras de garantizar un nivel de protección para los pacientes, personal de la salud y población en general. En la esfera de la salud, los medicamentos y los equipos médicos ocupan un lugar de elevada importancia, requiriendo un estricto control por parte de los estados que asegure la calidad, seguridad y eficacia en todo su ciclo de vida útil. En el mundo este control lo realizan diferentes Agencias Reguladoras,

las que establecen a través de leyes, directivas y regulaciones, el cumplimiento de su misión.

En la terapéutica actual se emplean equipos médicos de elevada tecnología en los que se combinan los medicamentos y los equipos en una misma presentación o durante su uso, lo que hace que se presenten dudas en cuanto a la categorización como uno u otro producto, existiendo indefinición para esta clasificación en el proceso regulador de evaluación y registro, previo a la comercialización. Es por ello que múltiples agencias han establecido regulaciones al respecto. Nuestro país, con niveles asistenciales a la altura de las sociedades desarrolladas, no es ajeno a esta problemática, ya sea para productos de fabricación nacional o importados.

El presente trabajo se ha realizado con el propósito de establecer los patrones de definición y tratamiento para clasificar un producto en Cuba, como medicamento o como equipo médico, por parte de las respectivas autoridades reguladoras nacionales, que son el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) [1], y el Centro de Control Estatal de los Equipos Médicos (CCEEM) [2], así como los casos en los que ambas instituciones deben participar conjuntamente para decidir sobre su categorización y/o evaluación. Luego de un análisis de la base legal cubana vigente, se determinó la necesidad del desarrollo e implementación de un

documento regulador en el que se establecieran los elementos necesarios para la delimitación, requisitos, información a presentar y las particularidades de la metodología de evaluación a seguir, tanto para los ensayos clínicos, como para el registro de los productos que se pudieran considerar en el límite entre medicamentos y equipos médicos. En este contexto, se desarrolló por parte del CECMED, como parte de una tesis asesorada para optar por el título de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, una investigación del estado regulador actual con la participación del CCEEM que tuvo como resultado la elaboración de la regulación “Directrices para la Delimitación de los Medicamentos y los Equipos Médicos” [3], aprobada por el Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública [4], siendo el objetivo de esta publicación, presentar en apretada síntesis el trabajo realizado y una breve información sobre el contenido de la misma.

### **Materiales y Métodos**

**Materiales.** Leyes, reglamentos y regulaciones sanitarias sobre medicamentos y equipos médicos y su delimitación, nacionales e internacionales.

**Método.** Revisión bibliográfica; evaluación comparativa de las disposiciones legales y normativas de la legislación y regulaciones internacionales y cubanas sobre medicamentos, equipos médicos y la delimitación entre ambos mediante la técnica de Uso de Puntos de Referencia “Benchmarking”; y entrevistas a expertos en la evaluación y el registro de medicamentos y de equipos médicos.

### **Resultados y Discusión**

Se comparó la base legal y normativa existente en Cuba sobre la evaluación y el registro de Medicamentos y Equipos Médicos y su delimitación con respecto a la del ámbito internacional, realizando el diagnóstico del nivel de amplitud y exactitud del respaldo normativo existente para ambos tipos de productos; se compilaron documentos que reglamentan y describen el alcance de la regulación, los términos y sus definiciones, y a partir de la entrevista a los expertos de ambas instituciones fue posible dimensionar las necesidades, proponer soluciones y realizar la consulta de las propuestas de soluciones brindadas. Este punto de partida, indispensable en la metodología de toda investigación, estuvo dirigido a las publicaciones de Organismos Internacionales, Multinacionales y de algunas autoridades reguladoras nacionales, seleccionadas por su experiencia y por ser consideradas las más representativas en el ámbito internacional sobre la materia. Algunos casos, como sucede con la Unión Europea (UE) [5-8] y la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, (FDA) [9] constituyeron una referencia obligada, debido a que marcan las pautas cuando de comercializar productos para el primer mundo se trata. Se revisaron en total 30 referencias internacionales y 21 nacionales. En la Tabla 1, se muestran las referencias que en particular, brindaron las bases para la propuesta nacional. Resultó evidente que existe una fuerte tendencia internacional de desarrollar lineamientos que permitan la categorización de estos productos, mientras que las agencias confirman o modifican las propuestas de los fabricantes a veces sobre bases no tan especificadas, como es el caso de la FDA. Se brindó especial atención a los respectivos reglamentos y requisitos para

el registro establecidos por las autoridades cubanas, el CECMED y el CCEEM [10-13] en cuanto a su alcance y a las definiciones de los medicamentos y de los equipos médicos identificándose la necesidad de actualizar y compatibilizar la terminología, así como la ausencia de tratamiento para los productos en el límite entre ambos. Sobre esto último las entrevistas a los expertos evidenciaron las dificultades confrontadas por fabricantes y evaluadores ante la falta de normativas, las que trajeron como consecuencia dilaciones en los tiempos de evaluación y falta de respaldo metodológico para realizarlas así como inadecuada orientación sobre la entidad a cargo de la evaluación de las solicitudes, los requisitos a cumplimentar y en algunos casos cambios en la categorización prevista para el producto.

Se diseñó un documento normativo para dar respuesta a cada una de las limitantes identificadas en el diagnóstico y se concluyó que el formato debía ser el de una regulación con nivel de aprobación en el Buró Regulatorio de Protección para la Salud Pública, como órgano superior del CECMED y del CCEEM. Los lineamientos resultantes se titularon “Directrices para la delimitación los medicamentos y equipos médicos” en lo sucesivo Directrices, y las mismas se dotaron de los siguientes bloques de información:

- Generalidades.
- Términos y definiciones.
- Criterios de categorización para la delimitación entre Medicamentos y/o Equipos médicos.
- Particularidades de la categorización y del régimen de evaluación para ensayos clínicos y registro.
- Bibliografía.

- Anexos: No. 1 “Resumen de las Características del Régimen de Ensayos Clínicos y Registro” y No. 2 “Ejemplos Ilustrativos para la Categorización de un Producto como Medicamento o como Equipo y/o Dispositivo Médico”.

En el capítulo correspondiente a Generalidades se describió la fundamentación, el objetivo y el alcance de la regulación, dirigida a establecer los elementos necesarios para la delimitación, los requisitos, la información a presentar y las particularidades de la metodología de la evaluación a seguir para los ensayos clínicos y el registro de los productos que se pudieran considerar en el límite entre medicamentos y equipos o dispositivos médicos, de importancia para los solicitantes de registro y las respectivas autoridades reguladoras cubanas.

Se definieron 10 términos indispensables para la aplicación de los requerimientos, entre ellos los de equipo y/o dispositivo médico y el de medicamentos, esta vez con un enfoque nunca antes abordado e ilustrativo de los elementos para su diferenciación.

Se presentaron los motivos más frecuentes de confusión que son la forma, vías, medios o mecanismos mediante los cuales los productos realizan su acción y los relacionados con el objetivo o indicación de los medicamentos y la aplicación o acción principal de los equipos. Los criterios para la delimitación entre medicamentos y/o equipos médicos que se deben utilizar para su categorización, fueron precisados como sigue:

### **1) Mecanismo de acción**

Un equipo no logra el objetivo para el que fue diseñado, por medios farmacológicos, químicos, inmunológicos ni metabólicos, sino que generalmente lo hace por medios mecánicos o físicos; aunque sí se puede

apoyar en estos mecanismos de manera accesoria para lograr su propósito.

Un medicamento, sigue generalmente, mecanismos farmacológicos, químicos, metabólicos e inmunológicos, para lograr su acción y puede incluir un dispositivo como soporte o vía para ello. No obstante, dado que existe un grupo de medicamentos que no actúan siguiendo estos mecanismos y para los cuales, por consenso se adopta esta categoría, la relación de los mismos se incluyó entre los ejemplos del Anexo 2 de las Directrices aprobadas.

## **2) *Indicación, aplicación o acción principal***

La categoría del producto como medicamento o equipo médico cuando se presentan en conjunto está definida, por el que de ellos logra la acción principal, contribuyendo el otro con lo que se ha llamado acción auxiliar, es decir que ayuda, pero no es el objetivo para el que se destina.

Se resumieron en cuatro las situaciones en las que ambos tipos de productos se presentan y/o emplean conjuntamente y se resalta en negritas la categorización en Cuba, según estas Directrices:

- **Medicamentos** que incluyen como soporte para lograr su acción un producto que, de ser utilizado de forma independiente, sería categorizado como equipo médico. Por ejemplo, jeringuillas prellenadas.
- **Medicamentos** que incluyen dispositivos médicos en la presentación para facilitar su administración. Por ejemplo, cremas vaginales con aplicadores.
- **Equipos médicos** que exhiben la acción principal y que adicionalmente incluyen un medicamento (en forma de sustancia o de producto terminado) que posee una acción auxiliar, y que, de ser utilizado de

## Delimitación entre medicamentos...

forma independiente, sería categorizado como medicamento. Por ejemplo, catéteres heparinizados.

- **Equipos médicos** destinados exclusivamente a la administración de un medicamento. Nebulizadores

En los procedimientos a seguir, para la evaluación y el registro o ensayos clínicos de estos productos se estableció que:

a) La categorización del producto como equipo médico o como medicamento sería realizada inicialmente por el Solicitante del registro, o del ensayo clínico según lo establecido en las Directrices y su expediente se confeccionaría con la aplicación de las mismas y del resto de la base legal y normativa al respecto previamente existente en el país.

b) El CECMED y/o el CCEEM realizarían una evaluación integral de la solicitud, para determinar si se trata de un medicamento o de un equipo médico, en la que se examinarán el propósito o aplicación al que se destina el producto, teniendo en cuenta la forma de presentación y el modo por cual se logra la acción principal.

Se definió que durante la evaluación para la aceptación de la solicitud, ambas agencias reguladoras serían responsables de confirmar o modificar la categoría de medicamento o de equipo y/o dispositivo médico propuesta por los Solicitantes y que en caso de modificarse la categoría, el Solicitante iniciaría nuevamente el proceso de solicitud, en el Centro correspondiente. En cambio, si fuera durante la evaluación integral de la solicitud del medicamento o equipo y/o dispositivo médico que se llegara a una conclusión diferente de la definida durante la recepción, el Centro que la aceptó corregiría el curso de la misma sin costo adicional, tratando de ajustarse a los plazos establecidos, o en

nuevos plazos acordados con el Solicitante.

c) EL CECMED y el CCEEM realizarían la evaluación correspondiente a los diferentes casos descritos, siguiendo el régimen para ensayos clínicos o registro que se describe en la Tabla 2, cuyo contenido se incluyó como el Anexo 1 de las Directrices. En la misma se describieron todos los casos, se especificó la categorización del producto como medicamento o equipo médico, el centro al que debía presentarse la solicitud, los requisitos adicionales a cumplimentar, los centros que participarían en el proceso de evaluación y, finalmente las particularidades reglamentarias aplicables.

### Conclusiones

- La investigación realizada diagnosticó la necesidad de desarrollar una herramienta metodológica nacional que diera respuesta a la delimitación de los medicamentos con relación a los equipos y/o dispositivos médicos para los ensayos clínicos y el registro sanitario, identificó los puntos clave a normar y las tendencias ya existentes en el mundo para su regulación.
- Como resultado del estudio se desarrollaron y aprobaron por el Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública las "Directrices para la delimitación entre medicamentos y equipos médicos", regulación en la que se definen con un enfoque regulador sanitario los casos límite entre estos tipos de productos, las características de sus solicitudes para ensayos clínicos y registro y las particularidades de las evaluaciones por el CECMED y el CCEEM o por ambos, como tratamiento regulador que se aplicará en Cuba al respecto.

- Se fortaleció el sistema regulador cubano debido a que fue normado un campo de la regulación sanitaria de medicamentos y de equipos y dispositivos médicos que hasta entonces permanecía indefinido, cuyo aporte favorece a los fabricantes y comercializadores, así como al trabajo integral y la eficiencia de las agencias nacionales que atienden estos productos velando por su seguridad, eficacia y efectividad, en beneficio de la sociedad.

### Referencias Bibliográficas

- [45] Creación del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Resolución Ministerial No. 73. MINSAP. C. de La Habana, Abril de 1989.
- [46] Creación del Centro para el Control Estatal de Equipos Médicos. (CCEEM) Resolución Ministerial No. 11. MINSAP. C. de La Habana, Enero de 1992
- [47] Directrices para la Delimitación de los Medicamentos y los Equipos Médicos. Resolución No. 04-2002. Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública. Ciudad de La Habana, 26 de Agosto del 2002
- [48] Resolución Ministerial de creación del Buró Regulatorio de Protección para la Salud
- [49] Directiva 93/42/CEE. Unión Europea. Directiva del Consejo. Disposiciones legales, reglamentarias y administrativas sobre Dispositivos Médicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1993
- [50] Directiva 65/65/EEC, relativa a productos medicinales (MPD)
- [51] Directiva 93/42/EEC, relativa a dispositivos médicos (MDD)
- [52] Directiva 90/385/EEC sobre los dispositivos médicos implantables activos (AIDMD)
- [53] Code of federal Regulations. Food and Drug. Sections 320.1 Definitions. Title: 21/ containing a codification of documents of general applicability and future effect/ Published by the Office of the Federal Register and Records Administration as an especial Edition of the Federal Register. Part 300 to 499 Revised as of April 1, 1999
- [54] Reglamento de la Evaluación Estatal y el Registro de los Equipos Médicos. Resolución Ministerial No. 110. MINSAP. C. de La Habana, Junio de 1992.

- [55] Requisitos para las Solicitudes de Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de Uso Humano. Resolución Ministerial No. 168. MINSAP. C. de La Habana, Octubre del 2000.
- [56] Reglamento para la Inscripción, Renovación y Modificación del Registro Sanitario de Medicamentos de Uso Humano. Resolución Ministerial No. 169. MINSAP. C. de La Habana, Octubre del 2000.
- [57] Regulación ER 1 Procedimiento para la Evaluación y Registro de un Equipo Médico. CECM. C. de La Habana, Julio de 1992.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Fuentes utilizadas para la confección de las directrices para la Delimitación entre Medicamento y Equipos Médicos.**

No.	Origen	Descripción de la Referencia
1	Unión Europea	Directiva 65/65/EEC, relativa a productos medicinales (MPD)
2		Directiva 93/42/EEC, relativa a dispositivos médicos (MDD)
3		Directiva 90/385/EEC sobre los dispositivos médicos implantables activos (AIDMD)
4	OPS	Glosario de Medicamentos, desarrollo, evaluación y uso
5	Australia	Distinción entre Medicamentos y Dispositivos Médicos (Device & Drug Distinctions)
6	Cuba	Reglamento para el Registro Sanitario de Medicamentos de Uso Humano.
7		Requisitos para el Registro de los Medicamentos
8		Reglamento para la evaluación Estatal y Registro de los Equipos Médicos
9		ER-1 Procedimiento para la Evaluación y Registro de un equipo médico
10		Guía General para la Evaluación y el registro de equipos Implantables
11		ER-9 Regulación Empleo de Normas en la Evaluación y Registro de los equipos Médicos
12		Resolución Ministerial No.110 de Creación del CCEEM
13		Creación del Buró Regulatorio de Protección para la Salud. Resolución MINSAP No. 132 de 1996
14		Creación del CECMED. Resolución MINSAP No. 73 de 1989,

Legenda: OPS Organización Panamericana de la Salud

Tabla 2. Resumen de las Características del Régimen de Ensayos Clínicos y Registro.

Descripción del Caso	Centro al que se presenta la Solicitud	Requisitos adicionales para la Presentación de la Solicitud	Centro (s) participantes en la evaluación	Particularidades
<b>A. Medicamentos</b> que incluyen como soporte para lograr su acción un producto que, de ser utilizado de forma independiente, sería clasificado como equipo médico.	CECMED	<p>Certificación del Sistema de Calidad con la que opera el fabricante del equipo médico en el país de origen. (Marcado CE para equipos europeos).</p> <p>Para el equipo médico aplicaciones médicas, parámetros específicos, características de funcionamiento (físicas, químicas y mecánicas), reglas de uso y de operaciones.</p> <p>Programas y métodos de ensayo, informe final y Certificados de los mismos. Sistema de Calidad en producción y posproducción.</p> <p>Información preclínica según requisitos reguladores.</p>	CCEEM	<p>Conforme Reglamento y Requisitos de Medicamentos vigentes.</p> <p>Previa obtención de LSOF</p> <p>Conforme Reglamento y Requisitos para Equipos y Dispositivos Médicos vigentes.</p> <p>Conforme Requisitos para la Autorización y Modificación de Ensayos Clínicos.</p>
<b>B. Medicamentos</b> que incluyen equipos médicos en la presentación para facilitar su administración. a) Con dispositivos para la medición aproximada b) Con dispositivos para la medición exacta c) Con dispositivos sin función de medición	CECMED	<p>Certificación del Sistema de Calidad con la que opera el fabricante del equipo médico en el país de origen. (Marcado CE para equipos europeos).</p> <p>(a) y (c) Especificaciones de Calidad (índices, límites y métodos de ensayo), composición y características de forma de los dispositivos).</p>	CCEEM	<p>Conforme Reglamento y Requisitos de Medicamentos vigentes.</p> <p>Previa obtención de LSOF</p> <p>(b) Conforme Reglamento y Requisitos para Equipos y Dispositivos Médicos vigentes.</p> <p>Conforme Requisitos para la Autorización y Modificación de Ensayos Clínicos.</p>
<b>C. Equipos y Dispositivos Médicos</b> que incluyen un medicamento que posee una acción auxiliar	CCEEM	<p>Para la sustancia: (a) Certificado de Buenas Prácticas de Manufactura, (b) Especificaciones de Calidad, (c) Validación de Métodos Analíticos, (d) Certificado de Análisis de la Sustancia y (e) Estudios de Estabilidad demostrativos de que las especificaciones se mantienen con el tiempo, almacenado conforme se recomienda.</p>	CECMED (Sustancia)	<p>Conforme Reglamento y Requisitos vigentes para Equipos y Dispositivos Médicos.</p>
<b>D. Equipos y/o Dispositivos Médicos</b> destinados exclusivamente a la administración de un medicamento	CCEEM	<p>Se requiere registro independiente del Medicamento y del Equipo y Dispositivo Médico. Al solicitar el registro del Equipo en el CCEEM debe presentarse el Certificado de Registro del Medicamento.</p>		<p>El Certificado de Inscripción del Medicamento especificará que el Equipo deberá estar registrado por el CCEEM. El Dictamen Final del Equipo declarará el DCI, la presentación, el vencimiento y el número de registro del medicamento y su fecha.</p>

Leyenda: SLSOF. Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas. Licencia de Fabricación.

## *DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA CUBANO DE RETIRADA DE MEDICAMENTOS DEFECTUOSOS DEL MERCADO*

Dra. C. Celeste Sánchez González<sup>1</sup>, Lic. Danay Mora Pascual<sup>1</sup>, Ing. Diana García García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

<sup>2</sup>FARMACUBA

### Resumen

Se destacó la importancia del sistema de retirada de medicamentos defectuosos del mercado como garantía de protección sanitaria a la población. Se desarrolló un diagnóstico nacional sobre su existencia, nivel de respaldo metodológico y consistencia con las disposiciones vigentes. Se identificaron las debilidades y se trabajó en su solución. Se amplió la base metodológica para la conducción y auditoría del proceso de retirada y se implementaron indicadores de efectividad, como herramienta de mejoramiento.

Se implementaron 55 Planes de Aviso para retiradas urgentes y no urgentes de medicamentos y vacunas en la cadena (autoridad nacional/ fabricantes/ comercializadores/ distribuidores mayoristas/ minoristas), y se integraron como sistema. Fueron definidos los flujos de distribución y se logró la mutua identificación de los participantes con sus roles.

El CECMED se destacó en la promoción del desarrollo del sistema, liderando la transformación del panorama nacional en cumplimiento de este indicador de la regulación sanitaria.

**Palabras claves:** retirada de medicamentos, regulación de medicamentos, indicador de regulación.

### Introducción

El accionar de una Autoridad Nacional Reguladora de Medicamentos (ANR), se caracteriza por su capacidad para regular y la efectividad que alcance en la implementación de la regulación. En este contexto, uno de los procedimientos más importantes corresponden a la retirada de productos defectuosos del mercado y los de confirmación de la destrucción de lotes no conformes. En los mismos descansa la seguridad de que, ante la detección de eventos adversos graves, y fallas relevantes de calidad, los medicamentos ya

ubicados en el mercado y comercializados, entre ellos las vacunas, no serán utilizados poniendo en peligro la salud de la población.

En nuestro país, la importación y distribución de medicamentos se realiza de forma centralizada por instituciones estatales y en función de las necesidades de toda la población como parte del sistema nacional de salud. Esto reviste de particularidades y magnitud a la cadena nacional de distribución y a los mecanismos de retirada de lotes y productos.

Por la relevancia de la existencia de tales sistemas, están considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como uno de los indicadores para evaluar los sistemas reguladores de medicamentos en las ANR [1]. Conforme a las tendencias actualizadas se debe contar al respecto con:

- Disposiciones legales y oficiales para la existencia del sistema de retirada;
- Comunicación documentada a los niveles requeridos de la cadena de distribución y con mecanismos de retroalimentación;
- Mecanismos para confirmar que se han tomado las medidas apropiadas; y
- Completa trazabilidad de los productos y lotes.

Este fue uno de los aspectos revisados por el equipo internacional de la OMS durante la inspección integral que realizaron en nuestro Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

(CECMED), en el proceso de precalificación de la vacuna cubana Antihepatitis B recombinante, a finales del año 2000. En esa fecha, se habían iniciado acciones con la aprobación de instrucciones sobre retiro y destrucción [2,3] y se había definido un Plan de Aviso preliminar, siendo necesario el desarrollo del sistema, la comprobación de los mecanismos propuestos y su perfeccionamiento.

De esta forma, hace algunos años, en Cuba, no existía un sistema integral para la retirada que abarcara desde el fabricante hasta la red minorista de distribución y al que perteneciera como importante elemento de aseguramiento de calidad la ANR nacional, no se dominaba por los participantes el flujo de las cadenas de distribución de vacunas y medicamentos, sus integrantes y vías de comunicación accesibles. Todo esto nos indicó la necesidad de realizar el presente trabajo, que tiene como objetivos:

### **General**

Desarrollo, implementación y perfeccionamiento de un sistema integral de retirada nacional en el que participen fabricantes nacionales, distribuidores y ANR que garantice de forma efectiva la retirada del mercado de los medicamentos defectuosos, evitando que sean utilizados de manera consciente o inconsciente y que con su empleo se ponga en peligro la salud de la población.

### **Específicos**

a) Realizar el diagnóstico de los procedimientos de retirada de medicamentos defectuosos de cada uno de los participantes en la cadena producción – distribución – autoridad, y contribuir a su desarrollo y al fortalecimiento de su base metodológica en cumplimiento de las

buenas prácticas y otras disposiciones vigentes.

- b) Definición con enfoque regulador, del flujo existente en Cuba para la cadena de fabricación-distribución de vacunas y medicamentos y las instituciones involucradas: (ANR, Fabricantes, Comercializadores, Distribuidores Mayoristas y Minoristas), y favorecer su mutua identificación.
- c) Garantizar el desarrollo de planes de aviso y de vías de comunicación para la retirada de medicamentos defectuosos en todas las entidades participantes, integrarlos como sistema y comprobar su funcionamiento.
- d) Desarrollar indicadores para la evaluación de los resultados de cada retirada y contribuir al mejoramiento continuo de la calidad de este proceso mediante la retroalimentación de la cadena con los resultados obtenidos.

### **Materiales y Métodos**

Con el objetivo de facilitar el trabajo de diagnóstico y desarrollo del sistema de retirada de productos defectuosos del mercado mediante su ejecución escalonada se establecieron dos etapas:

- **Primera Etapa:** Actividades con Vacunas (ANR, fabricantes, comercializadores y distribuidores mayoristas), a ejecutar en los años 2002 y 2003.
  - **Segunda Etapa:** Actividades con todos los medicamentos (fabricantes y distribuidores minoristas), a ejecutar entre los años 2003 y 2004.
1. Diagnóstico y desarrollo del sistema de retirada para vacunas (Primera Etapa). Se diseñó un “Ejercicio Metodológico”, como parte de esta estrategia y en apoyo a la implementación de las disposiciones

vigentes sobre retirada, que incluyó las siguientes metodologías:

- a) *Auditorías de cumplimiento de buenas prácticas aplicables al proceso de retirada en las diferentes entidades de la cadena de fabricación-distribución.*
  - b) *Rastreo de productos y lotes a lo largo de la cadena.*
  - c) *Desarrollo y comprobación de Planes de Aviso para toda la cadena dentro y fuera del horario laboral.*
  - d) *Identificación de indicadores para la medición de la efectividad de la retirada.*
  - e) *Desarrollo de metodologías y registros generales para (a), (b) y (c) válidas para el trabajo en cada entidad, y para la segunda etapa de este trabajo.*
2. Diagnóstico y desarrollo del sistema de retirada para Medicamentos (Segunda Etapa).
- a) *Evaluación de la existencia de planes de aviso, procedimientos de retirada y del cumplimiento de buenas prácticas mediante análisis de expedientes maestros. Este trabajo.*
  - b) *Incorporación al Sistema de Retirada a los fabricantes y distribuidores minoristas, con las metodologías anteriormente desarrolladas.*
  - c) *Determinación del flujo de distribución de medicamentos en esta fase de la cadena.*
3. Perfeccionamiento del sistema y sus componentes.
- a) *Ampliación de la base metodológica. Este trabajo.*
  - b) *Monitoreo de resultados. Medición de la efectividad con la aplicación de indicadores.*

## Resultados y Discusión

1. Sobre la base legal y metodológica existente formada por las Directrices de Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos [4], Buenas Prácticas de Distribución [5], la Instrucción No. 6-2000 del CECMED y el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [6;7], se realizó la Primera Etapa del diagnóstico y desarrollo del sistema de retirada de vacunas a partir de Mayo de 2002. En el ejercicio metodológico al efecto participaron 22 entidades nacionales, a saber, CECMED, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, (CIGB), Instituto Finlay, Heber Biotec S. A., Vacunas Finlay S.A., FARMACUBA, la Unidad Básica Empresarial Nacional (UEBNA) y 15 Unidades Mayoristas de Medicamentos (UBMM). Se realizaron 30 actividades referidas a planificación, Auditorías, rastreo de lotes y productos, desarrollo de planes de aviso e identificación de indicadores.

a) Auditorías. Una resultante de su planificación fue la “Lista de Chequeo Normalizada” para la evaluación de la documentación de retirada y planes de aviso. Fueron auditados 10 centros en los que se detectaron un total de 27 no conformidades y se formularon 10 recomendaciones. Las no conformidades más frecuentes fueron la ausencia de un plan de aviso, de retirada y la inconsistencia de los existentes con las normativas vigentes.

b) Rastreo de productos y lotes. Consistió en el seguimiento a través de la cadena fabricación-distribución mayorista de 4 productos en cuanto a su nombre y número

de dosis, de lote y el número de unidades desde su fabricación, liberación por el fabricante y el CECMED, entrega al distribuidor mayorista, confirmación de recepción de la distribución por las unidades municipales de Higiene y Epidemiología e información a FARMACUBA de unidades en existencia a la fecha del rastreo. Se confeccionó una planilla para este rastreo el que abarcó 6 niveles: Fabricante; CECMED; Comercializador; UEBNA (2); UEBMM (15) y Centros de Higiene Provincial (1) y Municipal (1). Como promedio las etapas rastreadas fueron 52, unas en Auditorías y otras mediante informes de balance de distribución enviados por las Provincias. Las no conformidades más frecuentes identificadas fueron la falta de conciliación del número de unidades (15,4%), tiempos de envío/recepción mayores de 11 días (9,6%), inconsistencias en las fechas de envío/recepción (7,7%) y falta de trazabilidad (5,8%).

c) Desarrollo y comprobación de Planes de Aviso. Para alcanzar este objetivo se confeccionó y distribuyó un formato para facilitar la presentación y uniformidad de los planes de aviso con la información a entregar. Fueron desarrollados 22 planes para retiradas urgentes y no urgentes, de ellos 1 por el CECMED, 2 por los fabricantes de vacunas, 2 por los comercializadores y 17 por los distribuidores mayoristas. En todos los casos fueron nombradas oficialmente mediante resolución 2 personas de contacto en cada entidad y la información fue enviada al CECMED. Los planes fueron comprobados telefónicamente para lo que se diseñó un “Registro de Comprobación” y un texto normalizado para su ejecución. Fueron confirmadas las personas de contacto, las que conocían de su posición en el Plan de Aviso, fueron

realizadas correcciones en los números telefónicos y otros datos, concluyéndose como satisfactoria la comunicación ya que en más de un 75% pudo realizarse entre 1 y 3 intentos. Los planes con correcciones se integraron y circularon a todos los participantes.

A partir de este trabajo, se obtuvo también un flujo actualizado de la cadena de fabricación-distribución nacional de vacunas que se hizo llegar a todos los participantes que son centros subordinados a los Ministerios de Salud Pública (MINSAP), Ministerio de la Industria Básica (MINBAS) y Consejo de Estado.

d) Identificación de indicadores de la efectividad de la retirada. Fueron identificados 2 indicadores, referidos a las unidades recuperadas en el retiro y al tiempo en el que se ejecuta el mismo.

• *Unidades recuperadas* (número y porcentaje): Representan la medida en la que se evitó la propagación del producto con defecto y del riesgo de causar accidentes, afectaciones y/o pérdidas de vidas humanas por concepto de no retirar todas las unidades defectuosas.

• *Tiempo del retiro.* (semanas, días y/o horas) Representa el tiempo que demora la retirada, incluyendo la notificación de retiro: mide la rapidez con la que es ejecutada la medida y brinda información del riesgo sanitario potencial, ya que mientras el producto no sea retirado existe la posibilidad de su uso. La fase determinante es la del tiempo necesario para desencadenar el aviso, ya que después que se recibe la notificación y se retiene el lote del producto afectado, el riesgo de uso disminuye.

2. Con la experiencia adquirida en el trabajo de vacunas y los documentos creados, se realizó la Segunda Etapa correspondiente al diagnóstico y desarrollo

de planes de aviso para medicamentos y la incorporación al sistema de retirada de los fabricantes y la red de distribución minorista, con cierre en Marzo del 2004. Se desarrollaron 6 actividades generales, referidas al diagnóstico de fabricantes mediante evaluación de expedientes maestros de fabricación y distribución, el desarrollo consecuente de los planes de aviso y su comprobación de forma análoga a la Primera Etapa. Participaron 50 instituciones: CECMED, Aica Laboratorios, Planta de Histoterapia Placentaria, Laboratorios Liorad y Novatec pertenecientes los cuatro al Polo Científico del Oeste y la Unión Industrial Química Farmacéutica (QUIMEFA) con sus 13 Empresas (18 sitios de fabricación) pertenecientes al MINBAS, la Dirección Nacional de Farmacia y Óptica, 15 Departamentos Provinciales de Farmacia del MINSAP y 15 Empresas de Farmacia y Óptica, subordinadas a los Órganos del Poder Popular.

a) El resultado del diagnóstico arrojó que el 24% de las 25 instituciones auditadas carecía de procedimientos para la retirada y que el 28% de los mismos no era consecuente con las buenas prácticas. Un 96% carecía de planes de aviso y la casi totalidad de los existentes no se ajustaban a las prácticas recomendadas.

b) Para el desarrollo y comprobación de planes de aviso e integración al sistema de los fabricantes de medicamentos se trabajó con QUIMEFA, la que centralizó los planes de todos sus fabricantes y con el Grupo de Comercialización del Consejo de Estado que en su labor de asesoría de buenas prácticas colaboró con las 4 plantas que a ese nivel fabrican medicamentos.

En lo relativo a la red de distribución minorista, se trabajó con la Dirección Nacional de Farmacias y Ópticas del MINSAP, entidad a cargo de la asesoría

técnico-metodológica de todas las farmacias del país. Se procedió con la misma metodología que para vacunas y el sistema abarcó 2 niveles: Direcciones Provinciales de Farmacia y las Empresas de Farmacia y Óptica del país. Se incorporaron 31 unidades comprendiendo las 14 provincias del país, el municipio especial y el nivel central. Se realizó la comprobación y corrección de la información del plan de aviso dentro y fuera del horario laboral y el sistema comprobado y actualizado se circuló entre los participantes. Actualmente todos los participantes se encuentran retroalimentados en cuanto a los resultados del Plan de Aviso General.

c) Como un resultado en este campo, se definió y circuló el flujo de la distribución minorista mediante la Estructura de los Servicios Farmacéuticos, para la distribución en farmacias, unidades hospitalarias y asistenciales. Cada participante identificó claramente su rol.

**3. Perfeccionamiento del sistema y sus componentes.** Monitoreo de resultados, aplicación de indicadores, actualización permanente de los planes de aviso y acciones en cada entidad. Cada centro estableció su plan de medidas, estrategia de desarrollo y perfeccionamiento

a) Ampliación de la base metodológica. Los procedimientos operacionales fueron ampliamente desarrollados. Las normativas de las diferentes entidades y la caracterización del desarrollo de la base metodológica alcanzado, como notable resultado del trabajo realizado, se muestra en la Tabla No. 1.

Se logró la integración de los planes de aviso para la retirada de productos del mercado en los sistemas de calidad. Cada una de las instituciones posee su propio sistemas de calidad y ha trabajado en vincular los planes de aviso y las retiradas

a las quejas y reclamaciones y sus investigaciones, a las destrucciones, metodologías de baja de producto y otras actividades relacionadas, ya que esta actividad no es independiente, sino que se inserta en las tareas de post-comercialización que deben acometer todos los que trabajan con medicamentos.

b) Evaluación de la efectividad de las retiradas mediante el empleo de los indicadores identificados. A partir de la aprobación de los nuevos procedimientos, en la empresa FARMACUBA, a cargo de la distribución mayorista de medicamentos, incluyendo las vacunas, se ha comenzado a realizar el “Informe de Conciliación y Cierre” para cada una de las retiradas que se concluyen. El mismo incluye valoración de cómo se condujo el proceso de retirada, las causas, medidas adoptadas, el cotejo de unidades distribuidas vs. retiradas y el tiempo transcurrido para realizar la retirada. El modelo se incluye en la Fig. 1.

### Conclusiones

Se desarrolló un sistema integral de retirada de vacunas y otros medicamentos defectuosos del mercado a niveles institucionales y nacional, estructurado con planes de aviso y procedimientos de respaldo conforme las disposiciones técnicas y legales vigentes, que incluyó las entidades a cargo de la fabricación, comercialización, distribución mayorista y minorista de medicamentos en Cuba, sus niveles centrales y el CECMED como ANR.

Se diagnosticaron y superaron las debilidades de los procedimientos existentes para las retiradas en cada entidad de la cadena fabricación-distribución-CECMED. Se desarrolló documentación normativa específica para la conducción y comprobación de los

procedimientos de retirada. Se capacitaron las entidades y se esclareció su papel y nivel de participación en las retiradas de productos.

Se definieron y divulgaron los flujos de la cadena de fabricación-distribución para vacunas y medicamentos con sus particularidades y se alcanzó la mutua identificación de los participantes.

Se desarrollaron y oficializaron más de 55 Planes de Aviso de la cadena de fabricación-distribución-autoridad nacional para las retiradas, los que integrados como sistema son de conocimiento general y permanente actualización.

Se dispone de los indicadores de tiempo y número de unidades para la medición de la efectividad de las retiradas, los que se emplean actualmente como herramienta para incrementar los niveles de control y efectividad alcanzados.

El CECMED se destacó en su papel movilizador, de fiscalización, didáctico y de promoción del desarrollo de planes de retirada efectivos en la cadena de fabricación-distribución, liderando la transformación del panorama nacional hacia un franco cumplimiento en este importante indicador del sistema de regulación de medicamentos.

### Referencias Bibliográficas

- [58] WHO Data Collection Tools for assessment of National Regulatory Authority (Vaccines). Vaccines & biologics and Access to Technology (ATT). Version 02 of December. Geneva, 2002.
- [59] Instrucción No. 06 / 2000. Precisiones Sobre el Procedimiento de Recogida de Medicamentos Defectuosos del Mercado y en Especial las Vacunas CECMED. C. de La Habana, 6 de Octubre del 2000.
- [60] Instrucción No. 07 / 2000. Precisiones sobre el Procedimiento de Destrucción de Medicamentos Defectuosos del Mercado. CECMED. C. de La Habana, 6 de Octubre del 2000.
- [61] Resolución No. 167 / 2000. Aprueba y Pone en Vigor la Regulación 16–2000 Directrices sobre

- Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. MINSAP. C. de La Habana, 4 de Octubre del 2000.
- [62] Resolución No. 04 / 98. Aprueba y pone en vigor la Regulación No. 11-98 Buenas Prácticas de Distribución de Medicamentos. CECMED. C. de La Habana, 20 de Mayo de 1998.
- [63] Resolución No. 173 / 2000. Establece el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas para Establecimientos. MINSAP. C. de La Habana, 4 de Octubre del 2000.
- [64] Resolución No. 01 / 2002. Aprueba y Pone en Vigor el Reglamento para la Aplicación del Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas. BRPS. C. de La Habana, 20 de Febrero de 2002.
- Recibido: 10 de septiembre de 2004  
Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Acciones de Fortalecimiento de la Base Normativa Operacional para la Retirada de Productos Defectuosos del Mercado.**

Institución	Año	Documento Normativo
CECMED	2002 (1)	Investigación de eventos adversos graves, mortales o asociación de casos. PNO: 18.002
	2003 (5)	Metodología para la elaboración y emisión de una Alerta Farmacológica. PNO:18.001
		Metodología para la evaluación e investigación de una queja. PNO:18.003
		Codificación de expedientes de una investigación postcomercialización. I: 18.001
CIGB	2003 (2)	Organización del expediente de investigación postcomercialización. I: 18.002
		Recepción de una queja por vía telefónica. I: 18.003
		Procedimiento Organizativo Previo a la Destrucción. PPO 4.29.031.98
Heber Biotec S.A.	2003 (1)	Procedimiento para la retirada de productos del Mercado. PPO 4.10.097.94
Heber Biotec S.A.	2003 (1)	Acciones de Heber Biotec S.A. para ejecutar la retirada de productos del mercado. PPO 4.30.016.02
Instituto Finlay	2003 (2)	Devoluciones de lotes de vacunas. PNO: 03.013
FARMACUBA	2004 (2)	Procedimiento de Baja de Productos. PNO: 03.007
		Acciones a desarrollar ante un Plan de Aviso. FG-PG-011-025
QUIMEFA	2004 (2)	Retiro del mercado de productos defectuosos. FG-PG-011-016
		Plan de Aviso para la retención y/o retiro productos defectuosos del mercado. DC-GC.PO107
Total	15 normativas implementadas	Acciones a desarrollar en caso de retiro del mercado de productos defectuosos. D-GC PO105

<b>No. 1</b>	<b>INFORME DE CONCILIACIÓN Y CIERRE</b>					<b>Código de Salida:</b>
<b>Entidad:</b>	<b>Código Procedimiento de Retiro:</b>			<b>Fecha:</b>		
				<b>D</b>	<b>M</b>	<b>A</b>
<b>Descripción del Producto:</b>					<b>Lote:</b>	
<b>Fabricante:</b>					<b>País:</b>	
<b>Clasificación del Retiro del Mercado:</b>			<b>Clase I</b>	<b>Clase II</b>	<b>Clase III</b>	
<b>Causa(s) del Retiro del Mercado:</b> Razones de seguridad.						
<b>Medidas adoptadas:</b>						
<b>Cantidades distribuidas:</b>					<b>Cantidades recuperadas:</b>	
<b>Efectividad del Retiro (%):</b>						
<b>Inicio del Retiro:</b>			<b>Terminación del Retiro:</b>			<b>Tiempo transcurrido:</b>
						semana(s)
						día(s)
						hora(s)
<b>D</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	
<b>Otra información relevante:</b>						
<b>Confeccionado por:</b>					<b>Cargo:</b>	<b>Firma:</b>
<b>Aprobado por:</b>					<b>Cargo:</b>	<b>Firma:</b>

Fig. 1. Informe de Conciliación y Cierre de una Retirada de Producto del Mercado.

## *CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE INSPECCIÓN FARMACÉUTICA ESTATAL EN EL CECMED*

Lic. Grethel Ortega Larrea, MSc. Mireya Coimbra Reyes, Lic. Jorge Ricardo Martínez Machín

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

### **Resumen**

Un objetivo de la Autoridad Reguladora de Medicamentos de Cuba, el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), es certificar en Buenas Prácticas a todas las entidades que fabrican, distribuyen, importan o exportan medicamentos en nuestro país; para ello se apoya en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas puesto en vigor a partir del 20 de abril del 2002, que complementa y fortalece el marco regulador del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal. A partir de la caracterización del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal en la Subdirección de Medicamentos del CECMED, desde abril del 2002; basándose en lo que establecen las regulaciones vigentes y en la información recogida en todos los registros que documentan la actividad desarrollada en el área de Inspecciones de la Subdirección de Medicamentos, se pudo conocer cómo se está comportando este proceso, sus desviaciones y como erradicarlas.

**Palabras claves:** inspecciones, licencias sanitarias, proceso de inspección.

### **Introducción**

Fabricar medicamentos con calidad, seguridad y eficacia es cada día más una premisa a cumplir por todos los fabricantes de medicamentos a nivel mundial, por lo que elevar el nivel de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación [1] es una necesidad actual de la Industria Farmacéutica Nacional.

En este período, la Industria Farmacéutica Nacional se encuentra en un proceso de cambios, asociado a las remodelaciones de las plantas de fabricación de medicamentos y a los cambios en los procesos tecnológicos; todo con el objetivo de certificar en las Buenas Prácticas de Fabricación [1] a todas las

entidades del Consejo de Estado, Grupo Empresarial Químico Farmacéutico, entre otros. Esto hace que el proceso de Inspección Farmacéutica Estatal en la Subdirección de Medicamentos tenga que fortalecerse para lograr estos objetivos y poder desempeñar con la calidad necesaria esta función, como le corresponde a la Autoridad Reguladora de Medicamentos de Cuba, el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos, CECMED.

El Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2], puesto en vigor a partir del 20 de abril del 2002 complementa y fortalece el marco regulador del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal, estableciendo para todos los fabricantes, distribuidores, importadores y exportadores de nuestro país el requisito de poseer la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas que los faculte a realizar las actividades inherentes a cada uno, lo que hace que se eleve el papel que desempeña el CECMED para lograrlo.

Por todo, era necesario caracterizar el proceso de Inspección Farmacéutica Estatal en la Subdirección de Medicamentos, a partir de abril del 2002 hasta junio de 2004, y evaluar el cumplimiento del Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2-3] en nuestra subdirección y, por último, valorar la evolución que ha tenido este proceso.

### **Métodos**

Se revisó lo establecido en el Reglamento Modificado de la Inspección Farmacéutica Estatal [1], el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [3] y el Flujo del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal.

Se realizó un análisis de la información recogida en los registros para la Programación trimestral de la Inspección Farmacéutica Estatal [4], Control de afectaciones a este programa y las solicitudes de Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas recibidas en la subdirección.

Se realizó un análisis estadístico con los tiempos reglamentados para el proceso de Inspección Farmacéutica Estatal.

Se revisaron, además, los 9 procedimientos normalizados de operaciones y las 2 instructivas que rigen esta actividad. Se tabularon y graficaron los datos que fueron obtenidos en el período estudiado.

## Resultados y Discusión

### ***I. Evaluación del cumplimiento del Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas en la Subdirección de Medicamentos***

A partir de octubre del 2000, se establece por Resolución Ministerial No. 172 el Reglamento de la Inspección Farmacéutica Estatal [4], donde se establecen los objetivos, las funciones y atribuciones de la Inspección Farmacéutica Estatal (IFE), la clasificación, organización y metodología para la ejecución de las mismas, la calificación, deberes y atribuciones de los inspectores y los deberes y atribuciones de las entidades sujetas a la IFE. En el año 2002, producto al desarrollo y fortalecimiento de la actividad de inspecciones en el CECMED,

se modifica este reglamento y se le añaden dos capítulos, uno sobre las infracciones y las sanciones y otro sobre las apelaciones.

Con la implantación, el 20 de abril del 2002, del Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitario de Operaciones Farmacéuticas puesto en vigor por Resolución 01/2002 del Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública [2], se establece los tiempos reglamentados para el desarrollo de todo el proceso de Inspección Farmacéutica Estatal. Se establecen además, los centros que serán objeto de Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas, se refiere a los centros que estén a cargo de:

- Fabricación de ingredientes farmacéuticos activos, medicamentos o ambos.
- Distribución de ingredientes farmacéuticos activos, medicamentos o ambos.
- Importación de ingredientes farmacéuticos activos, medicamentos o ambos.
- Exportación de ingredientes farmacéuticos activos, medicamentos o ambos.

En este caso bajo el control y supervisión del área de Inspecciones de la Subdirección de Medicamentos se encuentran: 21 centros productores lo que se corresponde con 42 líneas de producción o establecimientos, 36 distribuidores, 6 importadores y 3 exportadores de ingredientes farmacéuticos activos, medicamentos o ambos. (Tablas 1, 2, 3 y 4)

En correspondencia con lo anterior en la Fig. 1, se puede ver como se ha comportado el otorgamiento de las licencias en nuestra área.

En las Tablas 5 y 6, se muestran los centros productores e importadores

respectivamente, que cuentan con licencia ya que para el caso de los distribuidores y exportadores la totalidad de estos cuentan con la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas correspondiente otorgada de oficio por dos años, cumpliendo con lo establecido en el Capítulo IX Disposiciones Transitorias de este reglamento [3].

En este capítulo, al cual se hacía referencia con anterioridad, se establece que los establecimientos farmacéuticos de fabricación que no posean licencia y que no la hayan solicitado a la entrada en vigor de este reglamento deberían presentar al CECMED el modelo de solicitud y el Expediente Maestro para las operaciones de fabricación, contando hasta el 3 de enero del 2005 para concluir el proceso de otorgamiento de las licencias. En este caso, en la Tabla 7, se reportan los centros que se encuentran en esta situación.

En el presente Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2] se establecen los tiempos reglamentarios para el proceso de solicitud, emisión y renovación de las licencias, estos están divididos en tres tiempos establecidos:

4. 100 ó 160 días hábiles para los procesos que durante la inspección Farmacéutica Estatal Integral realizada no se otorgue la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas y continúe el proceso.
5. 130 ó 190 días hábiles para los procesos que concluyan durante la Inspección Farmacéutica Integral realizada se otorgue la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas.
6. 274 ó 334 días hábiles para los procesos que se necesite una Inspección Farmacéutica Estatal de Seguimiento para el otorgamiento de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas.

Atendiendo a este planteamiento realizaremos el análisis de forma individual para cada tiempo establecido, según el proceso.

a) Se establecen para este proceso [5] los pasos a realizar en el área de Inspecciones de la Subdirección de Medicamentos: 55 días hábiles para la evaluación de la documentación y emisión del dictamen para aceptarla como satisfactoria y pasar a realizar la Inspección Farmacéutica Estatal o para solicitar información adicional 30 días hábiles para la evaluación de la documentación de completamiento en los casos que sea necesario. Estas dos etapas no se realizan cabalmente en el área de Inspecciones de Medicamentos lo que posibilita que cuando se proceda a la revisión del expediente maestro como parte de la preparación de la Inspección Farmacéutica Estatal correspondiente se detecte que la solicitud no cumple con todos los requerimientos necesarios y provoque afectaciones al Programa de Inspección Farmacéutica Estatal del trimestre del área [6]. Este tiempo se utiliza en el área para el cumplimiento de otras tareas priorizadas.

Para este proceso clasificaron 6 Inspecciones Farmacéuticas Estatales Integrales. Como se puede observar hay valores de tiempo negativos dado por desviaciones en el proceso que están relacionadas con las prioridades del Grupo Empresarial Químico Farmacéutico (QUIMEFA), en este caso particular se realizó todo el proceso de Inspección Farmacéutica Estatal y posterior a su conclusión es que fue solicitado el trámite al CECMED.

Procediendo a un análisis más profundo de este proceso, podemos ver como de un tiempo establecido para la notificación de la Inspección Farmacéutica Estatal, no se

está cumpliendo el mismo lo que hace que promedie 6 días naturales el tiempo para la notificación.

Está establecido por los procedimientos normalizados de operación que rigen esta actividad, que transcurridos 20 días posteriores a la Inspección Farmacéutica Estatal realizada debe ser enviado el Informe de la misma en la entidad inspeccionada; este tiempo se está comportando generalmente dentro del límite de tiempo establecido, ya que en la mayoría de los casos se cumple, aunque hay desviaciones en el proceso; el promedio de duración es de 13 días naturales y 16 hábiles.

Estamos analizando un proceso que debe durar según lo establecido 100 días hábiles; en la Fig. 2, se observa la duración del mismo en las Inspecciones Farmacéuticas Estatales que se analizan en este grupo, la misma es de 126 días hábiles, como se puede concluir el proceso está desviado del tiempo establecido. En relación con el tiempo que transcurre desde que se solicita el trámite de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas correspondiente y la realización de la Inspección Farmacéutica Estatal, como se puede ver, el promedio de días que transcurre en este paso es de 112 días, por lo que sin haberse realizado la Inspección Farmacéutica Estatal ya el proceso está desviado.

**b)** Comenzaremos ahora la caracterización para los procesos que tiene como tiempo máximo establecido 130 días, en este caso se ubican 12 Inspecciones Farmacéuticas Estatales realizadas en este período.

Similar a lo ocurrido en el proceso anterior el promedio de días para la notificación de la Inspección Farmacéutica Estatal es de 6 días, pero hay desviaciones que oscilan

desde los ningún día hasta 31 días para la notificación.

Igualmente ocurre con el tiempo transcurrido entre la elaboración del informe y su envío en días naturales y hábiles, aunque el promedio es de 13 y 10 días respectivamente, aunque hay grandes desviaciones que oscilan entre los 63 y 50 días.

Finalmente, en la Fig. 3, veremos la duración de este proceso, a pesar de que el promedio es de 155 días y estar desviado del tiempo establecido ocurre en algunos casos que llega este proceso hasta los 420 días.

Podemos, ver la relación entre el tiempo que transcurre entre la solicitud de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas y la realización de la Inspección Farmacéutica Estatal que al igual que ocurrió con anterioridad se consume la mayoría del tiempo en este paso, llegando incluso a provocar desviaciones al proceso. Se observa también la presencia de valores de tiempo negativos provocados igualmente por solicitudes de Licencia Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas posteriores a la realización de la Inspección Farmacéutica Estatal.

**c)** Llegamos al análisis de los 6 casos que para el otorgamiento de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas necesitaron la realización de una Inspección Farmacéutica Estatal de Seguimiento.

Como en los casos anteriores no se cumple con el plazo para la notificación de la Inspección Farmacéutica Estatal, para un promedio de 4 días, el comportamiento de todas las Inspecciones analizadas.

El tiempo en días naturales y hábiles respectivamente entre la elaboración del informe de la Inspección Farmacéutica

Estatad y su envío estando el resultado de análisis dentro del plazo establecido.

En la Fig. 4, podemos ver que en este caso sí se cumple el plazo establecido de 144 días para la realización de la Inspección Farmacéutica Estatal de seguimiento, ya que el proceso completo dura como promedio 50 días hábiles.

Vuelven a aparecer tiempos negativos como en el caso de menos 159 días, ya que se solicitó al CECMED oficialmente el trámite de la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas en el momento de realizar el pago de la cuota final de la misma.

De manera general en los tres tipos de procesos el tiempo transcurrido entre la realización de la Inspección Farmacéutica Estatal y la elaboración del informe es de 13, 10 y 15 días respectivamente. Así como la duración de la Inspección Farmacéutica Estatal fue de 3 días como promedio.

### ***II. Valoración de la evolución del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal en la Subdirección de Medicamentos***

En la Tabla 8, podemos observar el total de Inspecciones realizadas por año de acuerdo a su clasificación. Es importante señalar como ha ido incrementándose el número de Inspecciones Farmacéuticas Estatales Integrales, y, además, que hasta junio de este año ya se han realizado 9, por 15 que se realizaron como total en el año 2003. Si tomamos en cuenta que en el mes de mayo, producto de la preparación para la Inspección de la Organización Mundial de la Salud que recibiríamos, no se programaron inspecciones y por el tiempo establecido en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas, en el capítulo de Disposiciones Transitorias, es de

esperar que para este año este número se haya al menos cuadruplicado. El número elevado de Inspecciones Farmacéuticas Estatales Especiales está en estrecha relación con la actividad de Postcomercialización, que por determinadas causas, ha necesitado la realización de este tipo de inspecciones.

En la Tabla 9, vemos como se ha comportado la programación trimestral de las Inspecciones Farmacéuticas Estatales. Esta programación está en correspondencia con lo explicado con anterioridad.

### ***III. Identificación de las principales no conformidades del Proceso de Inspección Farmacéutica Estatal en la Subdirección de Medicamentos.***

Para poder fortalecer el trabajo del Área de Inspecciones de Medicamentos es necesario identificar las desviaciones o no conformidades del proceso para poder trabajar en la erradicación de ellas.

Las principales desviaciones del proceso están dadas por:

No existe un número suficiente de inspectores para asumir la supervisión de todas las entidades que están bajo el control de la Subdirección de Medicamentos.

No cumplirse los tiempos establecidos en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2].

No se explotan todas los medios disponibles para el envío de documentación o notificaciones relacionadas con la Inspección Farmacéutica Estatal.

La respuesta a las prioridades de la industria y la situación de algunas entidades hace que se afecte la programación de las Inspecciones Farmacéuticas Estatales [6].

Hay trámites que documentalmente no cumplen con lo establecido en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2].

### **Conclusiones**

Solamente el 50 % de los fabricantes de medicamentos e importadores cuentan con la correspondiente Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas que los faculta para realizar dichas operaciones, ya que la totalidad de los distribuidores y exportadores la poseen de oficio. A pesar de que la mayoría de los centros de fabricación y distribución de medicamentos se encuentran en proceso de remodelación, muy pocos de ellos han presentado al CECMED las Tareas Técnicas para su evaluación. Hay etapas establecidas en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2-3], que en la práctica es imposible cumplimentarlas. Los tiempos establecidos en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas [2], no se están cumpliendo adecuadamente en la mayoría de los casos, provocando que el proceso sufra grandes desviaciones. El número de Inspecciones Farmacéuticas Estatales Integrales ha ido aumentando como respuesta al cumplimiento de lo establecido en el Reglamento sobre el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas. El número de inspecciones concisas ha ido disminuyendo producto del déficit de inspectores. Las prioridades establecidas por la Industria Farmacéutica provocan afectaciones a la programación trimestral de las Inspecciones Farmacéuticas Estatales. El déficit de inspectores líderes en el área no permite que se puedan realizar más inspecciones mensuales. Ha

quedado de manifiesto la necesidad que se realicen periódicamente autoinspecciones a este proceso para identificar las causas de las desviaciones del proceso y erradicar las no conformidades.

Es por esto que recomendamos realizar cada 3 meses el análisis de este proceso que permita regularmente comprobar las desviaciones que sufre y realizar un análisis periódico del proceso de Inspección Farmacéutica Estatal [4] en el área de Medicamentos que permita definir la frecuencia de inspecciones a establecer a la Industria Farmacéutica de Medicamentos.

**Referencias Bibliográficas**

- [65] Resolución No. 173 / 2000. Establece el Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas para Establecimientos. MINSAP. C. de La Habana, 4 de Octubre del 2000.
- [66] Resolución No. 01 / 2002. Aprueba y Pone en Vigor el Reglamento para la Aplicación del Sistema de Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas. BRPS. C. de La Habana, 20 de Febrero de 2002.
- [67] Resolución No. 167 / 2000. Aprueba y Pone en Vigor la Regulación 16-2000 Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. MINSAP. C. de La Habana, 4 de Octubre del 2000
- [68] Resolución No. 02/2002. Reglamento de la Inspección Farmacéutica Estatal. CECMED. 2002.
- [69] PNO. 03.001 Programa de Inspección Farmacéutica Estatal. Metodología para su elaboración, aprobación y utilización. CECMED. 2002.
- [70] PNO. 03.007 Realización de la Inspección Farmacéutica Estatal. CECMED. 2004.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

Tabla 1. Centros Productores y Establecimientos Farmacéuticos o Línea.

No.	Centro	Establecimiento Farmacéutico o Línea
1	Empresa Laboratorios AICA	Empresa Laboratorios AICA
2	Empresa Farmacéutica "8 de Marzo"	Línea de reenvaso de polvos estériles cefalosporánicos Línea de polvos para suspensión oral y cápsulas
3	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Julio Trigo"	Línea de inyectables líquidos y liofilizados Línea de colirios
4	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Reinaldo Gutiérrez"	Establecimiento Julio Trigo 102 Establecimiento Reinaldo Gutiérrez Taller Aldabó Laboratorio "Andrés Berro" Planta de Anticonceptivos Orales Planta Reyval
5	Empresa Productora de Sueros y Productos Hemoderivados "Adalberto Pesant"	Establecimiento "Adalberto Pesant" Establecimiento "Alberto Paz"
6	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Roberto Escudero"	Línea de cremas y jaleas Línea de ungüentos de base oleaginosa Línea de óvulos y supositorios Línea de ungüentos oftálmicos
7	Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay"	Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay"
8	Laboratorios NOVATEC	Laboratorios NOVATEC
9	Laboratorios LIORAD	Línea de inyectables líquidos (asépticos) y liofilizados en bulbos Línea de anestésicos dentales
10	Laboratorios MedSol	Planta 1 de Formas Terminadas Planta 2 de Formas Terminadas
11	CNIC	Agrupación Autopista
12	Combinado de Productos Dentales	Combinado de Productos Dentales (Pastas) Combinado de Productos Dentales (Líquidos)
13	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Juan R. Franco"	Establecimiento Juan R. Franco Establecimiento "Eduardo Reyes Canto"
14	Empresa Laboratorio Farmacéutico Oriente	Línea de Tabletas Línea de Polvos Línea de Soluciones Parenterales de Gran Volumen
15	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado"	Establecimiento "Saúl Delgado" Establecimiento "Ruiz Aboy"
16	Empresa Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales de Bayamo (Medilip)	Línea de Líquidos Orales Línea de Líquidos Tópicos Línea de Polvos
17	CIDEM	Planta de Citostáticos
18	CNIC	Centro de Ozono (Línea de Oleozón oral) Centro de Ozono (Línea de Oleozón tópico)
19	Centro de Isótopos	Línea de Ioduro de Sodio oral
20	Gasificadora Lisa	Planta de Gases Industriales
21	Iniciativas Industriales	Iniciativas Industriales

**Tabla 2. Centros Distribuidores de Ingredientes Farmacéuticos Activos y Medicamentos.**

No.	Centros Distribuidores	No.	Centros Distribuidores
1	Laboratorios Dalmer S. A.	12	UEBMM Las Tunas
2	Almacén No. 1 Medicamentos	13	UEBMM Santiago de Cuba
3	Almacén No. 4 Claudio Argüelles	14	UEBMM Ciudad de la Habana
4	Almacén No. 3 Eladio Cid	15	UEBMM Guantánamo
5	Almacén No. 2 Hermanos Ruiz Aboy	16	UEBMM Granma
6	UEBCM Nacional	17	UEBMM Cienfuegos
7	UEBMM Isla de la Juventud	18	UEBMM Pinar del Río
8	UEBMM Matanzas	19	UEBC Provincial Mayorista de Medicamentos
9	UEBMM Sancti Spiritus	20	Almacén Sagua la Grande
10	UEBMM Holguín	21	Almacén San Cristóbal
11	UEBMM Ciego de Avila	22	Almacén de Caibarién
23	Almacén San Antonio de los Baños	30	Almacén Colón
24	Almacén San José de las Lajas	31	Almacén 33 y 34 Camaguey
25	Almacén 507 Manzanillo	32	Almacén 36 Florida
26	Almacén Baracoa	33	Almacén 31 Nuevita
27	Almacén Mayarí	34	Almacén Palma Soriano
28	Almacén Moa	35	Almacén Territorial No. 10 Morón
29	Almacén Cárdenas	36	Almacén Banes

**Tabla 3. Centros Importadores de Ingredientes Farmacéuticos Activos y Medicamentos.**

No.	Centro
1	FARMACUBA
2	HEBER BIOTEC S. A
3	MEDICUBA
4	EMIAT
5	EMED
6	EMIDICT

**Tabla 4. Centros Exportadores de Ingredientes Farmacéuticos Activos y Medicamentos.**

No.	Centro
1	Laboratorios Dalmer S. A.
2	FARMACUBA



**Tabla 5. Centros Productores que cuentan con la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas para la Fabricación de Ingredientes Farmacéuticos Activos y Medicamentos.**

No.	Centro	Establecimiento Farmacéutico o Línea
1	Empresa Laboratorios AICA	Empresa Laboratorios AICA
2	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Reinaldo Gutiérrez"	Establecimiento Julio Trigo 102 Establecimiento Reinaldo Gutiérrez Taller Aldabó Planta de Anticonceptivos Orales Planta Reyval
3	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Roberto Escudero"	Línea de cremas y jaleas
4	Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay"	Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay"
5	Laboratorios NOVATEC	Laboratorios NOVATEC
6	Laboratorios LIORAD	Línea de inyectables líquidos (asépticos) y liofilizados en bulbos Línea de anestésicos dentales
7	Laboratorios MedSol	Planta 1 de Formas Terminadas Planta 2 de Formas Terminadas (Operaciones de envase)
8	CNIC	Agrupación Autopista
9	Empresa Laboratorio Farmacéutico Oriente	Línea de Tabletas
10	Empresa Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales de Bayamo (Medilip)	Línea de Líquidos Orales Línea de Líquidos Tópicos
11	CIDEM	Planta de Citostáticos
12	CNIC	Centro de Ozono (Línea de Oleozón oral) Centro de Ozono (Línea de Oleozón tópico)
13	Centro de Isótopos	Línea de Ioduro de Sodio oral
14	Gasificadora Lisa	Planta de Gases Industriales

**Tabla 6. Centros Importadores que cuentan con la Licencia Sanitaria de Operaciones Farmacéuticas para la Importación de Ingredientes Farmacéuticos Activos y Medicamentos.**

No.	Centro
1	FARMACUBA
2	HEBER BIOTEC S. A
3	MEDICUBA

**Tabla 7. Centros Productores y Establecimientos Farmacéuticos o Líneas sin LSOF.**

No.	Centro	Establecimiento Farmacéutico o Línea
1	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Julio Trigo"	Línea de inyectables líquidos y liofilizados Línea de colirios
2	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Reinaldo Gutiérrez"	Laboratorio "Andrés Berro"
3	Empresa Productora de Sueros y Productos Hemoderivados "Adalberto Pesant"	Establecimiento "Adalberto Pesant" Establecimiento "Alberto Paz"
4	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Roberto Escudero"	Línea de ungüentos de base oleaginosas Línea de óvulos y supositorios Línea de ungüentos oftálmicos
5	Laboratorios MedSol	Planta 2 de Formas Terminadas
6	Combinado de Productos Dentales	Combinado de Productos Dentales (Pastas) Combinado de Productos Dentales (Líquidos)
7	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Juan R. Franco"	Establecimiento Juan R. Franco Establecimiento "Eduardo Reyes Canto"
8	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Oriente"	Línea de Polvos Línea de Soluciones Parenterales de Gran Volumen
9	Empresa Laboratorio Farmacéutico "Saúl Delgado"	Establecimiento "Saúl Delgado" Establecimiento "Ruiz Aboy"
10	Empresa Laboratorio Farmacéutico Líquidos Orales de Bayamo (Medilip)	Línea de Polvos
11	Iniciativas Industriales	Iniciativas Industriales

**Tabla 8. Total de Inspecciones Farmacéuticas Estatales realizadas por año.**

AÑO	TIPO DE INSPECCION FARMACEUTICA ESTATAL				TOTAL
	Integral	Seguimiento	Concisa	Especial	
2002	7	1	4	17	29
2003	15	4	2	43	64
2004 *	9	2	1	5	17
TOTAL	31	7	7	65	110

\* Hasta junio

**Tabla 9. Comportamiento de la programación trimestral de las Inspecciones Farmacéuticas Estatales.**

PERIODO	TIPO DE INSPECCION FARMACEUTICA ESTATAL				TOTAL
	Integral	Seguimiento	Concisa	Especial	
2do Trimestre del 2002	-	1	1	-	2
3er Trimestre del 2002	1	-	2	1	4
4to Trimestre del 2002	4	-	2	-	6
1er Trimestre del 2003	8	-	2	1	11
2do Trimestre del 2003	5	2	-	4	11
3er Trimestre del 2003	7	1	-	3	11
4to Trimestre del 2003	7	2	-	3	12
1er Trimestre del 2004	11	1	-	1	13
2do Trimestre del 2004	7	1	-	4	12
TOTAL	50	8	7	17	82

**Fig. 1 Otorgamiento de las Licencias Sanitarias de Operaciones Farmacéuticas**

**Fig. 2. Duración del proceso de LSOF (días hábiles)**

**Fig. 3 Duración del proceso de LSOF (días hábiles)**

**Fig. 4 Duración del proceso de LSOF (días hábiles)**

**IMPLEMENTACIÓN DE LOS ENSAYOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS SUMINISTROS QUE SE UTILIZAN EN EL LABORATORIO NACIONAL DEL CECMED**

Tec. Mabel García<sup>1</sup>, MSc. Ivette Abreu<sup>1</sup>, Lic. Ana Lara<sup>1</sup>, Lic. Ania Fernández<sup>1</sup>, Lic. Natacha Reyes<sup>1</sup>, Dra. Diadelis Remírez<sup>1</sup>, MSc. Mario Landys Chovel Cuervo<sup>1</sup>, Lic. Zoila González<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

<sup>2</sup>IPK. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

### Resumen

Para evaluar la calidad de las pruebas que se llevan a cabo en los laboratorios involucrados en el proceso de producción y control de medicamentos, es de gran importancia la realización de ensayos para el control de calidad de los suministros que se utilizan. En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de esterilidad, conteo y viabilidad celular para los medios de cultivo y suspensiones, así como en el control de esterilidad de los materiales mediante la colocación de cintas termoindicadoras. En el período comprendido entre el 2001 al 2004, se realizó la evaluación de 180 medios de cultivo, así como 66 suspensiones celulares y 127 envíos de material. En la mayoría de los ensayos se obtuvieron resultados satisfactorios que cumplieran con los requisitos de calidad establecidos. En aquellos casos en que no se cumplieron los parámetros, los resultados fueron analizados, tomándose las medidas pertinentes, como desechar los suministros o rechazar los valores obtenidos en la prueba específica para la vacuna. Los resultados alcanzados demostraron la factibilidad de la implementación de los ensayos para el control de calidad de los suministros que se utilizan en el laboratorio de biológicos del CECMED.

**Palabras claves:** Control de calidad, esterilidad, conteo celular, viabilidad celular, cinta termoindicadora, Medio de cultivo, suspensión celular.

### Introducción

Los Sistemas de Aseguramiento de la Calidad controlan el nivel de confiabilidad y reproducibilidad de cada una de las fases de ensayo y producción de los productos biológicos propuestos para uso humano [1]. Todo laboratorio involucrado en el proceso de fabricación y control de medicamentos debe cumplir con los principios de las Buenas Prácticas de

Laboratorio (BPL). No obstante, para un Laboratorio Nacional de Control de Biológicos (LCB), responsabilizado con el control de la calidad, seguridad y eficacia de productos de tanto impacto como vacunas y hemoderivados, la introducción de los elementos relativos a las BPL y a Sistemas de Calidad en Laboratorios no es sólo un requisito, sino también una necesidad. Únicamente a partir de la correcta implementación de estos aspectos se podrá garantizar que los resultados provenientes de los ensayos posean el grado de confiabilidad requerido [2-3].

Para el control biológico de algunas de las vacunas ensayadas en el LCB (vacunas antipoliomielítica oral, antisarampionosa y DPT), así como para otras actividades técnicas del laboratorio (control microbiológico de los locales del Vivario y de los Gabinetes de Seguridad Biológica), se utilizan materiales estériles, medios de cultivo y suspensiones celulares que son suministrados por el Departamento de Esterilización y los Laboratorio de Medios de Cultivo y Cultivos Celulares del IPK.

A fin de garantizar que los componentes señalados cumplan con las especificaciones de calidad requeridas y teniendo en cuenta que los laboratorios del IPK no cuentan con un sistema de calidad establecido que permita auditar estos servicios, es imprescindible realizar controles internos al suministro de los mismos.

El ensayo de esterilidad permite identificar que los medios de cultivo se encuentren libres de contaminantes o gérmenes microbianos, el ensayo de viabilidad celular y de conteo del número de células garantiza que las células se encuentran en óptimas condiciones para la prueba [4]. Por otra parte, el control de la esterilización, mediante la colocación de indicadores químicos que varían su coloración cuando el proceso ha sido correcto, determina la factibilidad de utilizar el material en el ensayo.

La implementación de los ensayos para el control de calidad de los suministros constituye no sólo un útil instrumento para garantizar la eficiencia de nuestro laboratorio durante el proceso de control de la calidad de productos biológicos, sino también la mejor forma de evaluar de forma sistemática la adecuada aplicación de los elementos de BP y de Sistema de Calidad en el LCB del CECMED.

### **Materiales y Métodos**

Primeramente, se elaboró toda la documentación necesaria para la realización de los ensayos del control de suministros teniendo como base la revisión de la documentación reguladora internacional.

Se diseñaron los protocolos para el control de los suministros, determinando el número de lotes a analizar, la frecuencia de los ensayos, las responsabilidades y participación de cada uno de los analistas y la factibilidad de la implementación de los ensayos en las condiciones del laboratorio.

Se elaboró la metodología necesaria para la realización del control de suministros que se reciben del departamento del IPK, incluyéndose a su vez el control al servicio de medios de cultivo, suspensiones

celulares, y el control a la esterilización de materiales (Fig. 1).

Durante el período comprendido entre los años 2001 al 2004, se han recibido en el LCB las siguientes suspensiones celulares: Células Hep 2-C: Línea celular transformada, de origen tumoral, derivada de carcinoma laríngeo (Sistema celular sensible a la multiplicación del virus de la poliomielitis y, por tanto, utilizada en el ensayo de identidad, potencia y termoestabilidad de vacuna antipoliomielítica oral, tipo Sabin)

Células Vero: Línea celular obtenida de riñón de mono verde africano (Sistema celular utilizado en ensayos de control in vitro de algunas vacunas como la determinación de la potencia del componente diftérico de vacunas DPT y en los componentes sarampión y papera de vacunas Triple viral, por sólo citar algunos.

De igual forma se han recepcionado los siguientes medios de cultivo:

- Medio MEM, (utilizado para la preparación de los anticuerpos monoclonales del ensayo de potencia de vacuna antipoliomielítica).
- Medio 199, (utilizado en los ensayos que trabajan con células Vero).
- Medios utilizados en el control microbiológico.
- Medios agar cerebro - corazón.
- Agar triptona-soya.
- Agar Mueller-Hinton.
- Caldo Mueller-Hinton.
- Medios utilizados en pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo.
- Medios agar Hierro - Kliger.
- Agar Hierro - Lisina.
- Agar Tiosulfato - sales biliares.

En el caso del medio de cultivo, se realizó para el control de calidad, el ensayo de esterilidad, que permite determinar que los medios de cultivo se encuentren libres de contaminantes o gérmenes microbianos. Se inocularon en frascos 10 mL de cada uno de los medios. Se incubaron los frascos durante 7 días a 37° C y se realizó la observación visual diaria. Si a los 7 días, el medio de cultivo se observó transparente (Estéril), entonces puede utilizarse en el ensayo; si por el contrario, se observó turbio u opaco (Contaminado) fue desechado [5].

En el ensayo de viabilidad se incubaron las células Hep 2 C en medio MEM y las células VERO en medio 199, durante 7 días a 37° C y se realizó la observación diaria del mismo en el microscopio invertido. Este control se realiza de forma paralela al ensayo para el control de calidad de la vacuna en cuestión. Si a los 7, días se observó una monocapa confluyente, uniforme y con estructura celular definida las células se evaluaron como viables, lo que constituyó un criterio de validez del ensayo. Si por el contrario, la monocapa obtenida no fue confluyente, y no uniforme o existe daño o pérdida de la arquitectura celular no se aceptaron los resultados del ensayo [6].

El conteo celular se realizó utilizando la cámara de Neubauer. Se colocó la pipeta con una alícuota de la suspensión en el borde de la cámara para que se llenara por capilaridad y se contaron las células al microscopio. Se determinó el número de células en cada cuadrícula utilizando un contador automático [5]. El número de las células debe coincidir con el reportado por el laboratorio suministrador, en el caso de no ser así se rechaza el suministro [4].

El control de la esterilidad de los materiales se realizó mediante la colocación de la cinta termoindicadora de

forma aleatoria en cada uno de los envíos de material a esterilizar que incluyeron: cajas de puntas, viales, bulbos de 2,5 y 100 mL, pipetas de cristal de 1, 2, 5, 10 y 25 mL, canales sencillas y múltiples, tubos Corning de 25 y 50 mL, tapones de goma y retapas entre otros [7].

### Resultados y Discusión

Como resultado de la revisión bibliográfica, se elaboró toda la documentación relacionada con los ensayos para el control de la calidad de los suministros y los materiales. Se identificaron, elaboraron y aprobaron 3 procedimientos específicos de la actividad (procedimiento para el control de los suministros, para la utilización de medios selectivos y para el análisis de placas contaminadas). De igual manera se elaboraron las instructivas de uso de los equipos que se utilizan en los ensayos.

Se diseñaron los protocolos para el control de los suministros, estableciendo la frecuencia de cada ensayo, así como el número de muestras a analizar.

Como parte de la implementación de los ensayos de control de calidad de suministros y materiales durante el período que se analiza (2001-2004), se evaluaron mediante el ensayo de esterilidad de 103 frascos de medio MEM con aminoácidos no esenciales, y diferentes concentraciones de STF (20 al 2%, 6 al 4% y 28 al 5%) y 38 frascos de medio 199 (2% STF).

Como se aprecia en la Fig. 2, todos los frascos cumplieron con el requisito de calidad establecido ya que se observó el medio estéril a los 7 días de incubación.

Este resultado permitió la utilización de los medios en las pruebas biológicas de las vacunas [5].

En la Fig. 3, se establece la relación entre los lotes de medios de cultivo contaminados y estériles para los

suministros de medios de control microbiológico. La detección de contaminación bacteriana se produjo en el año 2001, para 3 envíos de medios de agar triptona soya. Luego del análisis microbiológico se identificaron como bacterias contaminantes estafilococos Gram (+), y streptococos Gram (+) que, según se describe en la literatura, pueden originar la contaminación [8-9]

Afortunadamente, la existencia del control nos permitió la detección de este problema antes de la emisión del resultado pertinente. Los medios se desecharon y se realizó una nueva solicitud al laboratorio de medios de cultivo.

Para controlar el servicio de suspensiones celulares se realizaron los ensayos de viabilidad celular y de conteo de las células.

En la Fig. 4, se muestran los resultados del ensayo de viabilidad de las suspensiones celulares recibidas en el laboratorio.

Se evaluaron 39 frascos Roux de 25cm<sup>2</sup> con células Hep 2c y 27 con células VERO. En la mayoría de los casos se observó que todas las suspensiones presentaban una monocapa confluyente (viabilidad celular) y estaban en las proporciones adecuadas, cumpliéndose así con las especificaciones establecidas para este suministro [5].

En algunas suspensiones celulares recibidas (2 suspensiones), se detectó que la monocapa obtenida no era confluyente y se observó daño en la arquitectura de las células, estas desviaciones fueron atribuidas a deficiencias en el suministro de CO<sub>2</sub> de las incubadoras [10-11]. Los valores obtenidos en estos ensayos fueron rechazados y se repitieron las pruebas de control biológico para las vacunas con resultados satisfactorios.

El conteo celular realizado a las 66 suspensiones celulares recibidas permitió

determinar que en todos los casos el número de células por mL se encontraban en el rango establecido para el ensayo [4-5].

Cada vez que se ha desarrollado una prueba, los materiales han sido esterilizados por calor húmedo y el color de la cinta testigo colocada durante cada esterilización cumplió con las especificaciones de calidad establecidas [7].

Los resultados obtenidos en este punto evidencian la validez de estos controles, como parte del Programa de Aseguramiento del laboratorio. Llama la atención lo referente a los resultados del control de medios de cultivo para células, pues es conocido que las posibilidades de contaminación de este tipo de medio es alta, lo cual nos permite cierto grado de confianza en el proveedor, que se refuerza por el hecho de que ningún ensayo ha sido considerado como no válido por esta causa. Sin embargo, sí se detectó contaminación en otros medios lo cual obliga a extremar los controles, en particular para este tipo de servicios. De igual forma, debe considerarse la posibilidad de auditar estas áreas del IPK, como parte del Convenio con nuestra institución, de modo que podamos ejercer un mayor control sobre las condiciones de estos suministros técnicos que recibe el LCB.

### Conclusiones

Producto de este trabajo se logró completar toda la documentación necesaria para la realización de ensayos de control de suministros, se logró elaborar el protocolo de suministros del LCC-I, y se facilitó implementar los controles a los suministros de medios y suspensiones celulares que se reciben en el Laboratorio de Control de la Calidad del CECMED.

### Referencias Bibliográficas

- [71] NC ISO-IEC 17025 Sistema de Calidad para Laboratorios de Calibración y Ensayo
- [72] Ferguson M et al. Conferencias Magistrales del II Curso de la Red Global de Entrenamiento de OMS "Implementación de un Sistema de Calidad en Laboratorios Nacionales de Control" 1998.
- [73] Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second Report. Geneva. WHO, 1992, Annex 2 (WHO Technical Report Series).
- [74] Manual of Laboratory Methods for Potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on immunization, WHO/BLG/95.1
- [75] PNO 12.053 Procedimiento para el control del servicio de medios de cultivo, soluciones y suspensiones celulares suministradas por el Laboratorio de Cultivo de Células del IPK.
- [76] de Lusting E, Nebel A. Cultivo de Tejidos. Un Manual Práctico. Capítulo 5 Metodos de Cultivo:49-56.
- [77] PNO 12.038 Procedimiento para la preparación y esterilización de materiales de laboratorio.
- [78] Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, capítulo 7, Crecimiento en placas de cultivo primario 20-24.
- [79] Métodos básicos de laboratorio de bacteriología clínica, Parte I, exámenes bacteriológicos, 67.
- [80] I.12.040 Uso y Conservación de la incubadora por CO<sub>2</sub> SELECTA 4000628
- [81] Manual de instrucciones. Incubadoras por CO<sub>2</sub> SELECTA 4000628.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

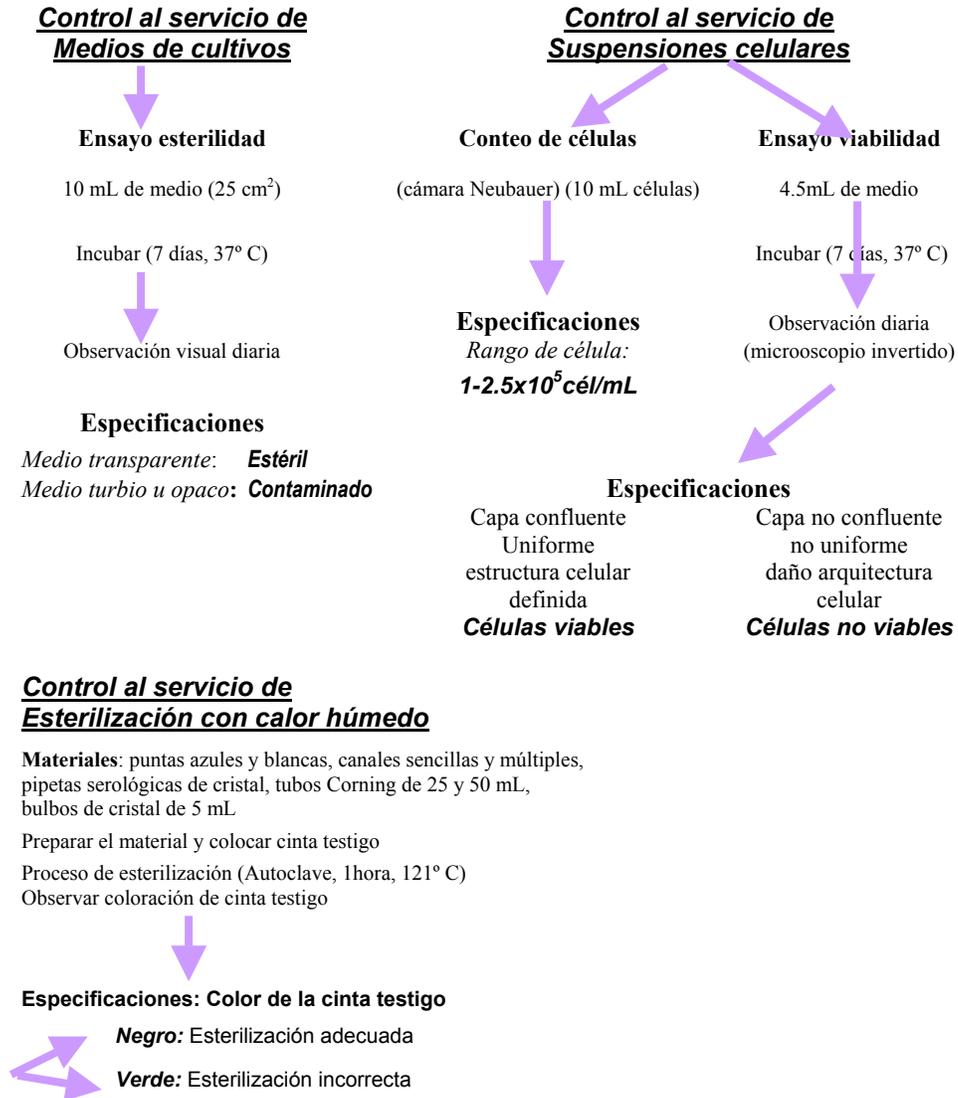


Fig. 1. Metodología para realizar el control de los suministros del IPK. Ésta es independientemente del tipo de medio o suspensión celular o material a esterilizar.

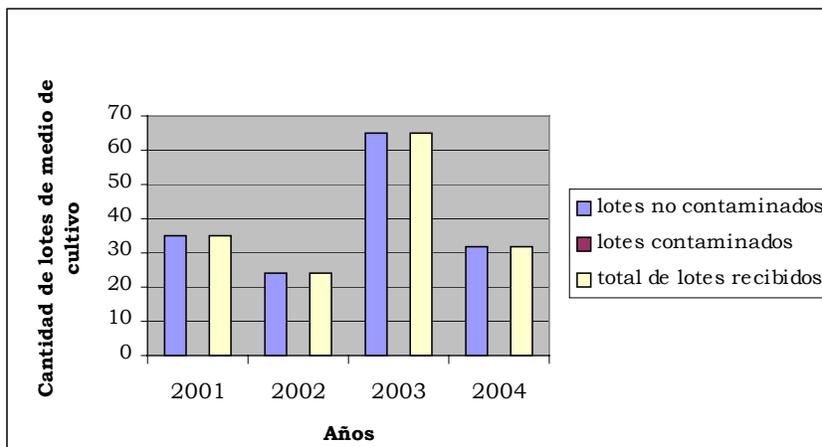


Fig. 2. Control de medios para cultivo de células recibidos en el LCC-I.

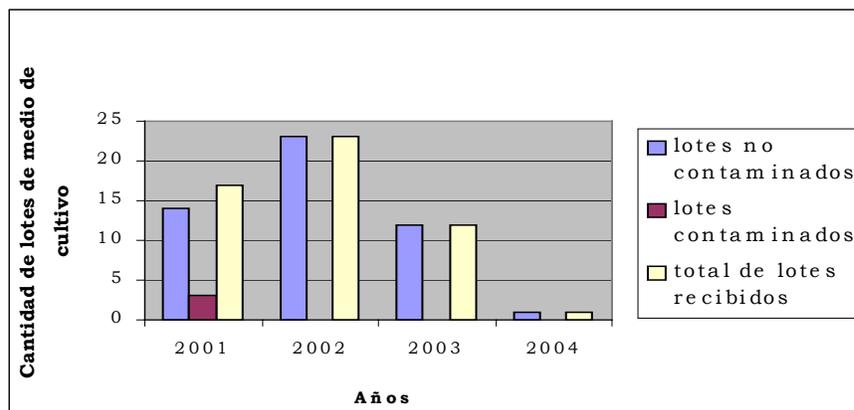


Fig. 3. Control de medios de cultivo bacteriano.

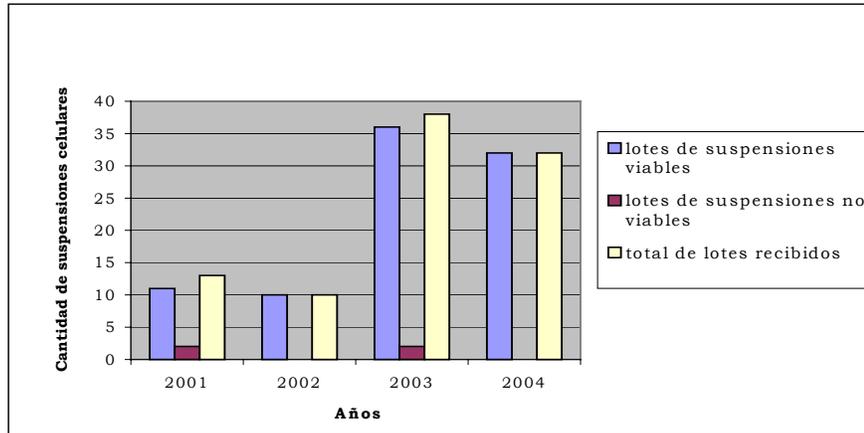


Fig. 4. Control de las suspensiones celulares recibidas en el LCC-I

## *PERFECCIONAMIENTO DE LAS LISTAS DE CHEQUEO PARA LA LIBERACIÓN DE LOTES DE VACUNAS*

Erich Duque Gil ([erich@cecmec.sld.cu](mailto:erich@cecmec.sld.cu)), Danay Mora Pascual, Juliette Escoto López, Yasmiany Pérez, Yanet Hechavarría Núñez, Ivón Pauste Cedeño

Departamento de Biológicos, CECMED

### **Resumen**

La liberación de lotes es el proceso de evaluación de cada lote individual de un producto registrado, para la aprobación de su posterior comercialización, el cual es llevado a cabo para vacunas y otros productos biológicos en la mayoría de los países.

En el presente trabajo se analizó la evolución del proceso de liberación de lotes para su perfeccionamiento, como parte de una de las 6 funciones establecidas por la OMS para una autoridad de control. Se analizaron las listas de chequeo y los Certificados de Liberación de Lotes que se han utilizado, explicando las diferencias y semejanzas de cada uno. Además, se propuso una nueva lista de chequeo, utilizando el programa Microsoft Excel para lograr la automatización y análisis de la información.

**Palabras claves:** certificación de lotes, lista de chequeo, liberación de lotes, vacunas.

### **Introducción**

Se dice que la industria farmacéutica es la industria más regulada en el mundo, ya que para poder comercializar un medicamento, por razones de salud, se exige que el mismo sea registrado con toda la información que describa su desarrollo farmacéutico, las instalaciones cuenten con licencia de producción que demuestre un comportamiento adecuado del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación y en algunos productos, como es el caso de las vacunas, se exige la liberación lote a lote por la autoridad reguladora nacional (ARN) de control establecida en cada país.

Es por ello que la OMS ha establecido un sistema de evaluación para las ARN de países suministradores de vacunas a los

organismos de Naciones Unidas (UNICEF), donde se incluyen seis funciones básicas en indicadores, dentro de las cuales se encuentra la actividad de liberación de lotes [1].

La liberación de lotes es exigida para vacunas y otros productos biológicos en la mayoría de los países y es obligatoria en Cuba [2], ya que los productos biológicos, tales como las vacunas, son moléculas complejas que no pueden ser químicamente definidas y, debido a su variabilidad inherente, cada producción debe ser considerada única. Es bueno destacar, además, la importancia del control independiente de cada lote de vacuna, ya que se administra a una población sana de niños y las mismas deben ser seguras y efectivas para programas públicos de salud.

La función de liberación de lotes se ha definido como un control independiente de cada lote de vacuna para asegurar que cumple con todas las especificaciones de calidad aprobadas, garantizando que el mismo tenga la seguridad y eficacia adecuadas [2].

Realizar el proceso de liberación de lotes, basado, como mínimo, en la revisión detallada del protocolo resumido de producción y control; establecer procedimientos y listas de chequeo; tener acceso a ensayos de laboratorio de ser necesaria la evaluación analítica del lote y desarrollar análisis de tendencias que permitan la discusión científica con los productores de los resultados obtenidos

son los requisitos a cumplir, según la OMS.

El presente trabajo tiene como objetivo re-diseñar e implementar listas de chequeo utilizando el programa Microsoft EXCEL para el perfeccionamiento de la actividad de liberación de lotes por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Para ello se procedió a comparar el comportamiento de esta función, empleando la lista de chequeo anteriormente utilizada y la diseñada mediante el programa Microsoft EXCEL, así como los Certificados de Liberación de Lotes utilizados en esta actividad desde sus inicios.

#### **Método**

La ejecución de este trabajo, se concibió de la siguiente forma:

7. Revisión bibliográfica de los criterios internacionales existentes en cuanto a la documentación necesaria para la confección de las Listas de Chequeo utilizadas en la Liberación de Lotes de vacunas.
8. Revisión y análisis de los Requisitos para la Liberación de Lotes de vacunas, establecidos en el CECMED [3-5], para conocer el alcance y base legal existentes.
9. Revisión detallada de las Listas de Chequeo en uso para la Liberación de Lotes de Vacunas. (Anexo I y II), con el fin de detectar insuficiencias en la información que recoge cada una de ellas y perfeccionarlas.
10. Se tomaron en cuenta las sugerencias y experiencia del grupo de inspectores de la OMS que sometieron a reinspección al CECMED del 3 al 5 de julio del 2003, como parte de la certificación de las autoridades.

11. Revisión de los Certificados de Liberación de Lotes empleados desde que comenzó a funcionar esta actividad.

12. Diseño e implementación de una nueva Lista de Chequeo utilizando el programa Microsoft EXCEL, en base a los aspectos fundamentales de la revisión bibliográfica y la experiencia adquirida anteriormente.

#### **Resultados y Discusión**

Para la revisión y análisis de los lotes a liberar es recomendado por la OMS la confección de listas de chequeo que recogen los pasos del proceso de producción y sus controles con el objetivo de verificar que el mismo cumple con las especificaciones establecidas, sugiriendo que su formato conste de un espacio donde se declare el número de entrada asignado con el fin de mantener la trazabilidad, además, permite verificar la información de cada sección del protocolo resumido de producción y control, incluyendo la revisión de la etiqueta y el registro de comentarios, observaciones y discrepancias encontradas durante la revisión.

El primer diseño realizado fue un registro de evaluación de lote, que recogía la información referente al lote presentado en el protocolo resumido de producción y control de lote a liberar, que se completaba de forma manual, quedando la evidencia en copia dura anexada al mismo, lo que dificultaba mucho evaluar el comportamiento de la consistencia de la producción de un producto en el tiempo.

Es importante señalar que con el desarrollo de la ARN, cada día son mayores las exigencias relacionadas con los productos biológicos, por lo que los fabricantes han tenido que ampliar la información que se brinda en el protocolo resumido para la

liberación de lotes, así como que se identificó la necesidad de crear una base de datos que permitiera la recogida de toda esta información para su posterior análisis y control mediante gráficos de tendencia, quedando la evidencia electrónica.

Con el cursar del tiempo ha sido necesario liberar otros productos biológicos para su comercialización, ya sea a petición del fabricante o liberados lote a lote, como en el caso de las vacunas, por lo que en el año 2002, se confeccionó un registro de evaluación para la liberación de lotes, específico para cada producto, lo cual se podía realizar de forma electrónica, quedando documentada y anexada al protocolo para su posterior archivo y una vez recogidos estos valores se copiaban en la base de datos que se diseñó en Excel para evaluar el comportamiento de la consistencia de la producción en el tiempo, mediante los gráficos de tendencia facilitándose aún más la actividad.

Por otra parte, la gran cantidad de lotes de vacunas a liberar, hizo imprescindible disminuir el tiempo destinado para esta actividad, siendo inminente la búsqueda de otra alternativa que ofreciera una solución a la problemática presentada, la que surge a partir de la necesidad de perfeccionar el Sistema de Liberación de Lotes de vacunas y el proceso evaluativo existente, con nuevas estrategias aplicadas durante el mismo.

Según fue descrito en nuestros objetivos y planificado en la metodología de este trabajo, como alternativa, a partir del mes de Mayo del año 2003, se rediseñó e implementó una lista de chequeo utilizando el programa Microsoft Excel, para lograr la automatización con el llenado de la misma, introduciendo los valores referentes a los índices evaluados durante la liberación del lote, quedando registrado automáticamente en los gráficos

de tendencia hasta la información del último lote que se haya evaluado, lo que permite obtener un comportamiento actualizado de los índices evaluados en el tiempo constituyendo una ventaja con respecto a la metodología antes empleada; puesto que al no tener disponible la información referente al último lote que se evaluaba, los resultados obtenidos del análisis de los gráficos de tendencia no coincidían con la realidad.

En la Lista de chequeo diseñada se recoge información sobre aspectos fundamentales que contribuyen a elevar el grado de conocimiento, lo cual constituye una ventaja, además, de que permite el acceso a la información correspondiente a la historia del lote, posibilitando conocer desde la fecha y hora en que se recibió el lote, hasta la fecha de liberación y de impresión. De esta forma se establecen especificaciones para controlar las deficiencias del proceso de liberación de lotes, donde se conoce el promedio de día que demora el mismo.

Con las mejoras incorporadas se han podido registrar las cantidades del producto que se libera, incluyendo los nuevos cambios efectuados en la liberación de lotes, para separar el llenado del envase (etiquetado y estuchado); puede ajustarse a la realidad, de que un lote tiene varios etiquetados y estuchados en dependencia del destino que tenga, lo que permite tener un mayor control de las veces que se etiquetó un lote, así como la reducción al máximo del tiempo de evaluación, puesto que se evita repetir información y de esta manera se libera el lote en el momento en que se libera el primer estuchado. Así, en posteriores estuchados solo se hace necesario evaluar la información correspondiente al proceso en cuestión.

Además, la nueva lista de chequeo permite validar los valores de los índices que alimentan la base de datos, si existiera algún valor fuera del límite se generan señales de alarma que facilitan al evaluador detectar que el mismo está fuera de especificación, lo que minimiza los errores y posibilita controlar este proceso.

La forma vertical de su formato permite seleccionar el diseño de impresión deseado y realizar los gráficos de tendencias de forma agrupada.

En la Tabla 1, se muestran las cantidades de lotes liberados por el CECMED, desde el año 1994 hasta la fecha, evidenciándose un aumento de los mismos en los últimos años y que en el primer semestre del año 2004 se han liberado más lotes que en todo el año 2003. Además, se ha incorporado la liberación de otros productos biológicos. Para dar cumplimiento a estas exigencias se hizo necesario un aumento de la rapidez con que se lleva a cabo este proceso incluyendo la realización de los gráficos y el análisis de las tendencias.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se puede comprobar que la implementación de la lista de chequeo para la liberación de lotes utilizando el programa Microsoft Excel, ha influido positivamente en el nivel de perfeccionamiento de la actividad de Liberación de Lotes, logrando agilizar su realización, disminuyendo significativamente los tiempos de evaluación de los lotes.

Otro aporte importante de nuestro trabajo es el proceso de evolución que han tenido los Certificados de Liberación de Lotes, puesto que en sus inicios existía un modelo de certificado que era llenado a mano y no brindaba una amplia información. Con el desarrollo de esta actividad se emitían dos certificados: Uno con información en Español y otro en Inglés, que era más amplia que la anterior.

Actualmente existe un Certificado de Liberación de Lotes que ofrece una información más detallada sobre el lote, en los dos idiomas y otros elementos tales como: La dirección, teléfonos, fax, correo electrónico y la página web del CECMED.

### **Conclusiones**

Se diseñó la lista de chequeo utilizando el programa Microsoft Excel, para el perfeccionamiento y agilización de la actividad de Liberación de Lotes por el CECMED.

La Introducción de la lista de chequeo diseñada evidencia un mejoramiento en la calidad de la actividad y una repercusión muy favorable en la agilización necesaria de la misma.

Para poder extender esta metodología a otros productos biológicos y continuar liberando lotes de vacunas con este sistema automatizado, se concluyó que se requiere de una máquina con velocidad de procesamiento y con buena memoria RAM para poder trabajar con una gran cantidad de valores necesarios para la actividad, en la base de datos diseñada.

La implementación de un solo formato de Certificado de Liberación de Lotes, que contiene una información más detallada del lote en los dos idiomas, agiliza la culminación de esta actividad, evitando la introducción de errores al mismo.

### **Recomendaciones**

Continuar la implementación de la lista de chequeo diseñada, en la actividad de liberación de lotes de vacunas.

Proseguir el monitoreo del comportamiento de la lista de chequeo diseñada, para aumentar el valor del presente trabajo, así como evaluar a largo plazo las ventajas que esta puede aportar.

Extender la metodología de trabajo de la lista de chequeo diseñada a otros productos biológicos, con el objetivo de lograr la generalización de este sistema automatizado para la liberación de lotes de los Biológicos.

### Referencias Bibliográficas

- [82] Vaccine-Assessment Tools For Review Of Regulatory Functions, NRA World Health Organization, 1 February 2003 - Rev.2.02
- [83] Training manual licensing, lot release, laboratory access, WHO- Department of Vaccine and Biological.
- [84] Regulación No. 19-2000 Requisitos para la liberación de lotes de vacunas. CECMED.
- [85] PNO: 06.007, Procedimiento Normalizado de Operación de Liberación de Lotes. Edición 01, 30 de Septiembre del 2002. CECMED.
- [86] I. 06.001, Elaboración de los Registros de evaluación para la Liberación de Lotes. Edición 01, 30 de Septiembre del 2002. CECMED.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Lotes liberados por el CECMED desde el año 1994 hasta la Fecha.**

Años	Lotes liberados por el CECMED
1994	67
1995	129
1996	170
1997	202
1998	116
1999	116
2000	294
2001	218
2002	354
2003	141
2004	182 *

\* Primer semestre 2004

**ASPECTOS ÉTICOS EN LOS ESTUDIOS CLÍNICOS CON LA NUEVA VACUNA  
SINTÉTICA CUBANA CONTRA EL *Haemophilus influenzae* TIPO b, Quimi-Hib**

MSc. Arlene Rodríguez Silva (arlene.rodriguez@cigb.edu.cu)<sup>1</sup>, Dra. María Eugenia Toledo Romani<sup>2</sup>, Dra. Verena Muzio González<sup>1</sup>, Dr. Aristides Aguilar Betancourt<sup>1</sup>, Dra. Raydel Martínez Sánchez<sup>2</sup>, Dra. Violeta Fernández Santana<sup>3</sup>, Lic. Alberto Baly Gil<sup>2</sup>, Dra. Santa Deybis Orta Hernández<sup>4</sup>, Dr. Eugenio Hardy Rando<sup>1</sup>, Dr. Vicente Vérez Bencomo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK)

<sup>3</sup>Centro de Estudios de Antígenos Sintéticos (LAGS), Facultad de Química, Universidad de la Habana

<sup>4</sup>Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

## Resumen

Para evaluar la vacuna sintética Quimi-Hib se realizaron 7 estudios clínicos. La población diana de esta nueva vacuna son los lactantes, que constituyen el grupo más vulnerable dentro de la sociedad. Los estudios clínicos se hicieron sólo después de haberse demostrado la inocuidad y seguridad del producto en los estudios preclínicos correspondientes. Se tuvo en cuenta el principio de la beneficencia y constituyó una condición indispensable la obtención del consentimiento informado de los voluntarios (adultos) o de los progenitores (ambos) de los niños de 4-5 años y lactantes. Además, se garantizó la preparación del personal involucrado en los estudios clínicos y el aseguramiento de la calidad, tanto de las instalaciones donde se obtuvo el producto, como del producto en sí. El comité de ética del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), el Grupo Nacional de Pediatría (GNP) y el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), tuvieron a su cargo la aprobación de los protocolos de evaluación y sus resultados finales. El cumplimiento de lo regulado en la experimentación con seres humanos permitió evaluar exitosamente la primera vacuna sintética contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), para uso en humanos.

**Palabras clave:** Ética, estudios clínicos, vacuna, *Haemophilus influenzae* tipo b, Hib, Quimi-Hib.

## Introducción

La ética es la parte de la filosofía que trata de la moral y de las obligaciones del hombre. Ella incluye el conjunto de normas que rigen la conducta humana, entre ellas la ética profesional. Un ensayo clínico (EC), desde su diseño hasta la publicación de sus resultados, debe tener

en cuenta un gran número de consideraciones éticas. El dejar de lado este principio llevó en el pasado a experimentos abusivos en el hombre. A los extremos más condenables se llegó, sin duda, en los campos de concentración del Tercer Reich. En los mismos se realizaron numerosas experiencias pseudomédicas: ablación de músculos, castración y esterilización, inoculación de enfermedades, formación de llagas infectadas, quemaduras por aplicación de fósforo, observación directa de la paralización del corazón e introducción de las personas en una bañera llena de hielo para medir los efectos fisiológicos del frío, o en una cámara de baja presión, para determinar los límites de la resistencia humana a las alturas extremas [1]. A los autores de estos actos les parecía lógico y defendible, por ejemplo, sacrificar unos cuantos prisioneros de guerra a fin de conocer el mecanismo de la muerte por inmersión en agua fría, pues sólo así se podría investigar cómo rescatar de una muerte segura a los pilotos que eran derribados en las frías aguas del Canal de la Mancha. Todo se reducía a intercambiar unas vidas, que eran estimadas en poco, por las vidas, mucho más valiosas, de unos soldados muy calificados y difíciles de sustituir [2].

En los últimos años la Medicina y la Tecnología han avanzado mucho. Los nuevos descubrimientos y trabajos en materia de prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades se han podido llevar a cabo gracias, en parte, a las investigaciones y ensayos que involucran a los seres humanos. Así, en 1931 aparece por primera vez el término "ensayo clínico" [1].

Para evitar cualquier tipo de abuso y atentado contra la dignidad de las personas en las investigaciones biomédicas, la comunidad internacional y los diferentes países han elaborado diferentes códigos éticos y normativas legales. Los dos pilares de la regulación de la experimentación humana son el Código de Nüremberg de 1947 [3] y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 [4] (revisada en Tokio, 1975; Venecia, 1983; Hong Kong, 1989; Somerset West, 1996; Edimburgo, 2000). En ellos se resumen los principios éticos de las investigaciones que involucran seres humanos.

Cuba no ha estado al margen en esta temática. En 1989 se creó el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), que es la autoridad nacional reguladora de medicamentos en el país. El CECMED tiene entre sus múltiples funciones, la de regular todo lo concerniente a las investigaciones clínicas. Con este fin se han emitido regulaciones, resoluciones y directrices donde se exponen claramente los elementos éticos a tener en cuenta cuando se quiere hacer un estudio clínico. El CECMED es quien aprueba la realización o no de un estudio clínico a través del análisis de la Solicitud de Autorización de Estudio Clínico (SAEC). Este es el único trámite que evalúa el citado centro de manera gratuita y como

vía para estimular que no se utilice un medicamento sin haber pasado la evaluación de la autoridad nacional reguladora.

El objetivo de este trabajo es presentar los aspectos éticos considerados en la evaluación clínica de la vacuna cubana sintética contra Hib, ya inscrita en el Registro de Medicamentos e introducida en el Programa Nacional de Inmunizaciones de Cuba en el año 2004. Para ello se hizo un análisis del diseño de los estudios y el cumplimiento de las normas establecidas para la experimentación segura de vacunas en seres humanos.

El disponer de esta vacuna a nivel industrial ha contribuido a un importante ahorro de divisas al país, por concepto de sustitución de importaciones. Además, la venta de la vacuna en el mercado internacional constituirá una nueva fuente de ingresos, por concepto de exportaciones, en un futuro cercano.

### **Métodos**

Se llevaron a cabo 7 EC en sujetos sanos, 2 en adultos, 2 en niños de 4-5 años de edad y 3 en niños lactantes.

Los EC se diseñaron y ejecutaron según la última revisión de la Declaración de Helsinki [4] (Edimburgo, 2000), la Regulación No. 21-2000 del CECMED con los Requisitos para la Solicitud de Autorización y Modificación de Ensayos Clínicos [5], la Resolución No. 165/2000 del CECMED con las Directrices sobre Buenas Prácticas Clínicas en Cuba [6], la Regulación No. 26-2000 del CECMED con los Requerimientos para el Manejo y Uso de los Productos en Investigación en los Ensayos Clínicos y Responsabilidades de las Partes [7], las Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos en Investigación

del año 2002 [8], también del CECMED, entre otras regulaciones.

## Resultados y discusión

### *Población diana: niños lactantes*

Quimi-Hib es una vacuna profiláctica que se diseñó para ser usada en los niños lactantes de 2, 4, 6 y 18 meses de edad, considerados población vulnerable. Los códigos de ética señalan que en la investigación clínica, requieren una particular protección, aquellos seres humanos que son más vulnerables desde el punto de vista biológico, social o jurídico. Ellos son los embriones, fetos, niños, mujeres gestantes, ancianos, deficientes mentales, pacientes terminales, personas internadas en instituciones penitenciarias o benéficas, pobres y vagabundos [1]. En el diseño para la evaluación clínica de Quimi-Hib se consideró esta situación.

En primer lugar, se partió del conocimiento de las enfermedades transmitidas por Hib y la necesidad de nuevas vacunas contra esta bacteria que justifican la realización de los EC. Un elemento importante es el hecho de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que por falta de vacunación anti-Hib mueren entre 400 000 - 700 000 niños pequeños por año en todo el mundo [9].

En segundo lugar, los EC no se iniciaron hasta haber concluido los ensayos preclínicos de toxicología y farmacología. Los resultados de estos ensayos en ratas y conejos demostraron la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna en las especies de animales utilizadas.

En tercer lugar, se realizaron EC previos a los estudios en lactantes y se seleccionaron para ello, grupo de edades menos susceptibles de ser afectados por eventos adversos inesperados como fueron los

adultos sanos y los niños sanos de 4-5 años de edad.

El primer estudio fue un EC fase I que se realizó con adultos sanos (40 sujetos), para evaluar la reactogenicidad del producto y conocer las posibles reacciones adversas que pudieran presentarse. Con este estudio se tuvo la certeza de que el producto era seguro en este grupo de edad.

El segundo estudio fue un EC fase I con niños sanos (133 sujetos) de 4 y 5 años, para evaluar nuevamente la reactogenicidad del producto en un grupo más cercano en edad a los lactantes. Los resultados fueron similares a los observados en el primer estudio.

El tercer estudio fue un EC fase I nuevamente en adultos sanos (40 sujetos), para evaluar la reactogenicidad de la vacuna que contenía un adyuvante. Una vez demostrada la seguridad del producto en dos grupos de edades menos vulnerables que los lactantes, se realizó el primer EC fase I en los niños lactantes (139 sujetos) para evaluar la reactogenicidad del candidato vacunal en la población diana.

El candidato vacunal cubano demostró ser seguro, con muy pocas reacciones adversas, todas ligeras, en proporciones similares a las encontradas en la vacuna comercial y estos resultados permitieron pasar a los EC fase II para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna en una muestra mayor.

El primer EC fase II, se realizó en niños sanos (1041 sujetos) de 4 y 5 años de edad, pues por tratarse de una vacuna contra Hib con un antígeno sintético, era imprescindible apreciar su comportamiento primero en niños mayores. La característica de un antígeno sintético le confería al candidato vacunal un alto grado de novedad. Una vez que el producto demostró ser inmunogénico en

estos niños, se realizó el sexto EC de fase II en los lactantes (1141 sujetos). Este estudio sería el que definitivamente probaría la eficacia de la nueva vacuna en el grupo de edad para el que había sido diseñado. Se realizó un séptimo EC con los lactantes que participaron en el EC FI. En este estudio se inmunizaron los niños de 18 meses de edad para evaluar el comportamiento de la vacuna Quimi-Hib como dosis de refuerzo, condición que deben cumplir las vacunas Hib conjugadas antes de ser licenciadas. En la Tabla 1 se reflejan los EC realizados.

La vacuna Quimi-Hib se administró a un total de 1499 personas. Se siguió un orden en los ensayos, que permitió acumular datos sobre la seguridad del candidato vacunal en la medida en que se descendía en las edades de la población investigada.

#### ***Principio de beneficencia***

En el informe Belmont de 1978, elaborado por una comisión nombrada por el Congreso Norteamericano, se define la beneficencia como uno de los principios éticos básicos en investigaciones con seres humanos [1]. Este principio refiere el no perjudicar, maximizar la utilidad y minimizar el posible perjuicio o riesgo, de manera que el estudio sólo se justifica si existe una probabilidad razonable de que el sujeto se beneficiará con los resultados de la investigación. Este principio se tuvo en cuenta para cada grupo de edad evaluado, pues se trataba de poblaciones sanas donde dos de ellas se consideraban vulnerables.

En todos los EC, previo a la vacunación, se realizó un interrogatorio y un examen físico detallado que permitió detectar enfermedades de forma precoz o confirmar la condición de sanos.

En ninguno de los EC se utilizó placebo y ello fue especialmente importante en los

lactantes, pues hubiera representado dejar a estos niños sin protección. El empleo del placebo puede estar éticamente justificado en el campo terapéutico para su uso como terapia sugestiva sobre el enfermo o cuando no hay una terapia efectiva reconocida [1]. Teniendo en cuenta que la mayoría de los casos con enfermedades por Hib ocurren entre los 3 y 24 meses de edad y que es rara antes de los 3 meses y después de los 5 años [10], los EC fueron controlados, y para ello, se utilizó la vacuna comercial Vaxem Hib (Chiron, Italia), disponible en el mercado.

Los procedimientos para la toma de muestra de sangre de la región calcánea del pie en el caso de los lactantes y del pulpejo del dedo pulgar en el caso de los niños de 4-5 años, se seleccionaron sobre la base de que se produjera un mínimo de molestias o daños.

Los niños de 4-5 años fueron, además, beneficiados con la participación en los EC porque la campaña de vacunación contra Hib comenzó en nuestro país en 1999, por lo que esta cohorte de niños quedó sin vacunar y es un grupo de edad todavía susceptible de adquirir enfermedades transmitidas por Hib. El nivel preciso de anticuerpos requerido para la protección contra la enfermedad invasiva no está claramente establecido. Sin embargo, a partir de los estudios de inmunidad natural, inmunización pasiva y de la vacuna Hib basada en el polisacárido sin conjugar, se ha concluido que concentraciones de anticuerpos anti-Hib superiores o iguales a 0,15 µg/mL en el suero correlacionan con la protección a corto plazo. Los valores mayores o iguales a 1 µg/mL correlacionan con la protección a largo plazo contra la enfermedad por Hib [11]. Antes de la vacunación un 13% de los niños de 4-5 años no estaba protegido a largo plazo y posterior a esta, el 100%

alcanzó títulos mayores o iguales a 1 µg/mL, lo que significa que todos quedaron protegidos.

Por otro lado, es conocido que Hib es un huésped habitual del árbol respiratorio del ser humano y el hombre es el único hospedero. La puerta de entrada es la nasofaringe y una vez que los microorganismos la colonizan, pueden permanecer durante varios meses sin que aparezcan síntomas clínicos. Este estado se conoce como portador asintomático [12]. Se plantea que la modificación de dicho estado portador está asociado a la vacunación y al incremento de los títulos por encima de 5 µg/mL [13]. La inmunización con el candidato vacunal en niños de 4-5 años, ofrecía la ventaja de eliminar el estado de portador y disminuir así la transmisión de la bacteria a otras personas. En la práctica se vio que un 74 % de los niños no alcanzaban los niveles de anticuerpos que correlacionan con la eliminación del estado portador y después de la vacunación, un 67% incrementó sus títulos por encima de 5 µg/mL. Estos resultados tienen significación clínica y gran importancia potencial debido a que estas concentraciones se asocian a la eliminación del estado de portador de Hib de las fauces en los individuos. De esta manera se corta la cadena de transmisión.

En el caso de los adultos en particular, se realizaron además, 10 exámenes de laboratorio antes y después de la inmunización para demostrar que la salud de los individuos no había sido afectada. Se constató que antes y después de la vacunación los indicadores de salud (hemoglobina, leucograma, eritrosedimentación, glicemia, bilirrubina total, bilirrubina indirecta, bilirrubina directa, TGP, TGO y creatinina) se mantuvieron dentro los límites normales.

### ***Consentimiento informado***

En el Código de Nüremberg de 1947, se establece por primera vez la obligatoriedad del consentimiento informado y se recogen los principios básicos del mismo. Entre ellos se incluyen: la persona afectada deberá tener capacidad legal para consentir; deberá estar en situación tal que pueda ejercer plena libertad de elección, sin impedimento alguno de fuerza, fraude, engaño, intimidación, promesa o cualquier otra forma de coacción o amenaza; y deberá tener información y conocimiento suficientes de los elementos del correspondiente experimento, de modo que pueda entender lo que decide [3].

También en la Declaración de Helsinki se considera obligatoria la obtención del Consentimiento Informado. En el informe Belmont se amplía la definición de este y se plantea que el participante se mantenga informado a lo largo del estudio y entienda completamente los riesgos y beneficios. La legislación cubana también recoge este principio fundamental, cuyos elementos son la voluntariedad, la comprensión y la información.

El principio de voluntariedad plantea que el consentimiento es válido sólo si se da voluntariamente. Ello implica que no existe ningún tipo de coerción ni influencia indebida en ninguno de sus grados, persuasión o manipulación. La coerción tiene lugar cuando se presenta intencionadamente una exageración del peligro de la enfermedad para conseguir el consentimiento. La influencia indebida ocurre cuando se ofrece una recompensa excesiva, no garantizada, inapropiada o impropia u otra propuesta con el objeto de obtener el consentimiento [1].

El principio de la comprensión refiere que la forma y el contexto en el cual es facilitada la información es tan importante como la información misma. Así, el presentar la información de una forma

rápida y desorganizada, sin dejar tiempo suficiente para meditarla o considerarla, o escatimar oportunidades para cuestionarla, puede afectar negativamente la capacidad del sujeto para tomar una decisión. Por otro lado, es necesario adaptar la presentación de la información a la capacidad del sujeto, en el lenguaje más asequible y evitar los tecnicismos. Los investigadores son los responsables en última instancia de asegurarse de que los sujetos hayan comprendido la información [1].

El principio de la información es el que mayor relevancia adquiere en la investigación clínica, fundamentalmente porque los posibles riesgos no están definidos como sucede en la práctica médica, y además, porque en ocasiones es preciso no especificarlos de forma detallada para evitar los posibles sesgos de valoración de la respuesta a distintas intervenciones. Sin embargo, en ningún caso está justificado el engaño [1].

La obtención del consentimiento informado es un punto clave en la investigación de vacunas en humanos; pretende proteger al sujeto de la investigación de otros posibles intereses. No ha de ser un simple requisito legal o un trámite administrativo, sino que es un derecho humano.

Todos estos elementos se observaron, de forma rigurosa, en los EC con la nueva vacuna anti-Hib.

Para obtener el consentimiento informado en cada EC con la vacuna Quimi-Hib, primeramente se realizó una convocatoria inicial a los sujetos adultos que formaban parte del centro seleccionado para el ensayo. En la misma se explicaban las características del estudio, los beneficios, riesgos, derechos y retribuciones si consintieran en su participación en el mismo. Además, se aseguró que no tendría

ninguna repercusión en los resultados docentes, en el caso de los estudiantes, el hecho de que se negaran o decidieran retirarse del EC, como tampoco lo tendrían en su centro de trabajo los voluntarios participantes del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y la Universidad de la Habana. En el caso de los estudios con niños de 4-5 años, el médico de la familia que atiende el círculo infantil, debidamente adiestrado por el Investigador Principal, dio la información a los padres de los niños de estas edades. Igualmente, se les informó que la participación de sus hijos era voluntaria y que podrían retirarlo de la investigación en cualquier momento sin perjuicio alguno. Para los estudios con lactantes el médico de la familia, debidamente adiestrado por el Investigador Principal, explicó a cada puérpara durante la consulta de captación del recién nacido, donde también se encontraba el pediatra del grupo básico de trabajo, los objetivos del estudio clínico, así como las ventajas y los riesgos de su participación.

A los voluntarios que se ofrecieron para participar en cada caso y a los padres que manifestaron disposición para que su hijo participara en el EC, se les brindó toda la información necesaria a través de charlas y material escrito. Mediante los mismos se explicaron el diseño del estudio, los objetivos y la importancia del mismo, las ventajas y los riesgos de la participación y en qué consistiría la misma, las características del producto y las ventajas para nuestro país al contar con una vacuna contra Hib. Se informó de algunas características en general sobre el microorganismo y las enfermedades que transmite, se dijeron las posibles reacciones adversas con un lenguaje asequible y que las administraciones se realizarían en vacunatorios debidamente

habilitados para atender cualquier evento adverso inesperado, incluyendo reacciones anafilácticas. Se informó sobre el grado de confidencialidad de los datos, además, se les explicó que serían informados en todo momento si se dispusiera de una nueva información que pudiera ser relevante para su decisión de continuar en el ensayo.

Después de haber recibido estas informaciones, se brindó un tiempo prudencial de una semana para que cada cual pensara sobre su decisión y posteriormente se les preguntó si deseaban o no participar en el estudio. Los casos afirmativos firmaron el consentimiento informado de forma voluntaria. No hubo coerción ni influencia indebida. Los investigadores del estudio fueron los responsables de obtener el consentimiento de los sujetos.

La información fue debidamente comprendida y siempre se ofreció al sujeto la oportunidad de indagar sobre cualquier duda o aspecto de interés.

#### ***Calidad de la vacuna***

En las directrices sobre las buenas prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos en investigación [8], editadas por el CECMED en el 2002, se deja claro el estándar de calidad y de aseguramiento de la calidad que deben tener, tanto la instalación donde se obtiene el producto, como el producto en sí para ser usado en un ensayo clínico. Ello constituye un aspecto importante de la ética al garantizar: 1) que haya uniformidad entre lotes y dentro de cada lote del producto en investigación para de este modo, asegurar la confiabilidad de los ensayos clínicos; 2) la uniformidad entre el producto en investigación y el producto comercial y, por consiguiente, que los resultados del ensayo clínico sean pertinentes en cuanto a la eficacia e

inocuidad del producto comercializado y 3) proteger a los sujetos que participan en ensayos clínicos frente a productos en investigación de mala calidad que sean el resultado de errores de fabricación (omisión de pasos críticos tales como esterilización, contaminación y contaminación cruzada, mezclas de productos, rotulado erróneo, etc) o de la calidad insuficiente de las materias primas y otros componentes. El promotor es el responsable de garantizar la calidad del fármaco en estudio.

Los lotes de vacuna utilizados en los EC con Quimi-Hib, fueron aprobados por la dirección de calidad del CIGB y autorizados por el CECMED para su uso.

La formulación del producto en investigación utilizada durante los EC es la misma que se utiliza en el proceso productivo a escala industrial.

Las instalaciones donde se fabricaron los lotes de vacuna, se inspeccionaron por el CECMED para determinar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción. Dicha entidad autorizó el desarrollo de las operaciones farmacéuticas.

#### ***Controles externos***

No sólo los investigadores son los encargados de asumir la responsabilidad de un experimento, la protección debe garantizarse también a través de un comité de ética independiente que deberá dar su parecer sobre el protocolo de la experimentación, analizará éticamente las condiciones en que se obtiene el consentimiento informado, si se cumplen las directrices del Código de Nüremberg, de la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas. Además, analiza la magnitud de los riesgos y beneficios calculados y las garantías de seguridad incorporadas en el proyecto. De esta

manera, dicho comité de ética influye positivamente en la calidad de la investigación [1].

Dentro de los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki se resalta que el protocolo experimental debe ser puesto a la consideración, comentario y aprobación de un comité de ética, que debe ser independiente del investigador, el patrocinador y de cualquier otra influencia.

En 1971, en los EE.UU se empezó a exigir la aprobación de todos los protocolos por parte de comités de ética, creados en julio de 1966 con el nombre de comités de revisión institucional [14].

Los requisitos para la solicitud de autorización y modificación de ensayos clínicos editados por el CECMED, en el 2000 [5], incluye dentro de las consideraciones éticas generales de la investigación, la revisión y aprobación del protocolo del ensayo, no sólo por parte del comité de ética, sino también por parte de la Autoridad Nacional Reguladora de Cuba que es el CECMED.

Los protocolos de los EC con Quimi-Hib se sometieron a la evaluación del comité de ética y revisión (CER) del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", que fue el centro evaluador de este producto. El CER estuvo compuesto por 5 miembros suficientemente calificados, dado por su experiencia, reconocimiento obtenido, diferente formación y su procedencia, uno de ellos un miembro lego. El CER fue informado permanentemente sobre la marcha de los estudios.

Dichos protocolos se sometieron, además, a la evaluación del Grupo Nacional de Pediatría (GNP) en el caso de los estudios con niños, del grupo de Auditoría de Aseguramiento de la Calidad del CIGB, de la jefa del grupo de vacunas del CIGB y del CECMED a través del trámite de

Solicitud de Autorización de Estudios Clínicos que incluye, además del protocolo, otro grupo importante de informaciones. Todos los EC se aprobaron por las distintas entidades.

Los EC se monitorearon por el CIGB que fue el centro patrocinador de los estudios. Las visitas de monitoreo tuvieron lugar antes, durante y después de la ejecución de cada EC.

Los monitores ejecutaron visitas de inicio de estudio clínico para avalar y declarar a cada área de salud y locales seleccionados por los investigadores, como aptos para desarrollar allí la investigación. Los monitores, además, participaron en cada uno de los talleres de unificación de criterios impartidos por los investigadores, velando por la calidad del diseño de cada uno de los ensayos propuestos, la preservación de la confidencialidad de los voluntarios y por la inclusión del número de niños estrictamente necesario para cumplimentar los objetivos de acuerdo a cada fase del ensayo ejecutada. En cada visita de monitoreo se inspeccionó que el investigador principal contara con la Carpeta del Investigador y que ésta incluyera los documentos mínimos esenciales para la conducción del mismo (protocolo clínico actualizado, cartas de aprobación de los comité de ética y del grupo nacional de pediatría, manual del investigador, certificados de liberación de los lotes de medicamento en ensayo, así como el certificado de autorización de inicio de estudio clínico emitido por el CECMED). Se verificó también que cada sujeto incluido en el estudio tuviera su cuaderno de recogida de datos y acta de consentimiento firmados por él o por los padres y/o tutores en el caso de los niños. Se llevó a cabo un seguimiento de las cuestiones relacionadas con la transportación, tales como la cadena de

frío y la documentación de la entrega y recepción del producto en ensayo clínico. Este control aseguró que las vacunas se entregaran en óptimas condiciones para su utilización en los receptores. Se revisaron todos los controles de temperatura de los termos y de los refrigeradores antes de comenzar cada acto de vacunación.

Los monitores velaron por el doble cegaje del estudio. Se inspeccionó el dominio de la técnica de administración del medicamento por la vía intramuscular. Se chequeó que los materiales durante el estudio fueran estériles y desechables. Se verificó la coincidencia de la etiqueta de embalaje del medicamento, así como el número de inclusión e iniciales del sujeto con lo declarado en el listado aleatorio oficial de cada estudio. Las visitas de monitoreo también incluyeron la revisión de al menos, un 30% de los Cuadernos de Recogida de Datos (CRDs) del estudio. Con esto se pudo verificar que los médicos y especialistas registraron de forma activa los diferentes eventos adversos encontrados. Los monitores entregaron a las áreas de salud bulbos de la vacuna comercial Vaxem Hib para inmunizar a los sujetos que abandonaron el estudio o que por alguna razón fueron excluidos después de iniciado el mismo.

En cada vacunatorio se llevó a cabo un control del medicamento utilizado y no utilizado durante el EC. Los bulbos de vacuna vacíos, así como los no utilizados y los desechos de jeringuillas prellenadas se recogieron e incineraron una vez concluido cada ensayo. Posterior a esto, el departamento de Bioseguridad del CIGB emitía un certificado de dicho acto.

Se elaboró un informe una vez concluida cada visita de monitoreo. En el mismo se recogieron las dificultades detectadas y las posibles soluciones en cada caso, en acuerdo con los investigadores. En

general, se evidenció la adherencia al protocolo clínico aprobado y un cumplimiento de lo normado en las Buenas Prácticas Clínicas.

El CECMED llevó a cabo dos auditorías a los EC. Las conclusiones de las mismas también quedaron recogidas en los respectivos informes.

Todo lo anterior permitió la continuidad de la evaluación clínica de la vacuna.

### ***Otras consideraciones éticas***

El Código de Nüremberg en su 8<sup>vo</sup> punto refiere que los experimentos deberían ser realizados sólo por personas calificadas científicamente. Deberá exigirse de los que dirigen o participan en el experimento el grado más alto de competencia y preparación, lo que significa que los investigadores del equipo que dirigirá el estudio y en particular el investigador principal, deben tener un Curriculum Vitae (CV) que respalde su capacitación para llevar a cabo la investigación [3]. El CECMED también se ha referido a la preparación del personal que trabaja en un EC y la actitud a seguir ante las emergencias médicas [5]. Esta importante consideración ética se tuvo presente en la evaluación clínica de Quimi-Hib. El equipo de investigadores y todo el personal se preparó a través de seminarios, curso sobre buenas prácticas clínicas y talleres de unificación de criterios, todo lo cual quedó reflejado en el Manual del Investigador. Los CV de los investigadores estuvieron disponibles y se adjuntaron a los Informes Finales de los EC. Cada vacunatorio estuvo preparado para atender cualquier evento adverso inesperado y contaban con las indicaciones de la conducta a seguir en caso de reacciones adversas graves.

La confidencialidad de los datos y de la identidad del sujeto es otro aspecto reflejado dentro de las normativas que tratan sobre la ética en los EC. Uno de los principios establecidos en la Declaración de Helsinki plantea que es obligación proteger la privacidad y dignidad del sujeto en estudio, por lo que la confidencialidad de los datos debe garantizarse [4]. El CECMED tiene establecido que se informe a los sujetos sobre la confidencialidad de la información y datos de su identidad y que esta información sólo podrá ser revisada por el personal autorizado durante las visitas de chequeo y de control de la calidad o en caso de reacción adversa grave inesperada.

En los EC con Quimi-Hib se garantizó la absoluta confidencialidad de los datos personales de los sujetos de manera que toda la información de los mismos quedó bajo custodia de los responsables del ensayo y en los Cuadernos de Recogida de Datos se trabajó con las iniciales del nombre de cada uno. Se respetó en todo momento la confidencialidad individual del paciente y en el consentimiento informado se dijo explícitamente: *He conocido, además, que los datos de esta investigación sólo serán del conocimiento del equipo de investigadores, y se garantizará la confidencialidad de los mismos.*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha manifestado preocupación por otro asunto que también puede demostrar falta de ética en los estudios clínicos: el fuerte peso que tienen los intereses comerciales en los ensayos clínicos de nuevos medicamentos. Así, se han dado casos en que se ocultaron datos desfavorables, o se retrasó la publicación de investigaciones que no concluían lo que esperaban los patrocinadores. Algunos han

propuesto que se adopten normas internacionales que completen la Declaración de Helsinki que refiere que en las publicaciones de los resultados clínicos, los investigadores están obligados a preservar la exactitud y precisión de los datos, ya sean negativos o positivos [1]. En el caso de los EC con Quimi-Hib, tanto el promotor (CIGB), como los investigadores acordaron no publicar ni dar resultados del ensayo sin el consentimiento de ambas partes. Se conservan las bases de datos y los datos primarios de cada uno de los participantes y los mismos están disponibles para auditoría por parte de autoridades reguladoras. Recientemente se publicó en la revista Science (vol 305 23 July 2004), el primer artículo que refiere algunos resultados de los EC con esta nueva vacuna [15].

### Referencias Bibliográficas

- [87] Vega J. La experimentación con humanos. (Serial en línea) 1999 (citada 08 abril 2004) (35 pantallas). Disponible en: [http://www.bioeticaweb.com/index.php?id\\_cat=1&PHPSESSID=5ad835fca0385319d845adedde92a587](http://www.bioeticaweb.com/index.php?id_cat=1&PHPSESSID=5ad835fca0385319d845adedde92a587)
- [88] Herranz G. ¿Es racional oponerse al uso de embriones humanos para fines de experimentación? (Serial en línea) 2004 (citada 10 abril 2004) (7 pantallas). Disponible en: <http://www.geaweb.org/03Bio/033.htm>
- [89] Código de Nuremberg. (Serial en línea) (citada 10 abril 2004) (6 pantallas). Disponible en: [http://www.bioeticaweb.com/index.php?id\\_cat=1&PHPSESSID=4d257eebc05a82b62258590c8c6b0a89](http://www.bioeticaweb.com/index.php?id_cat=1&PHPSESSID=4d257eebc05a82b62258590c8c6b0a89)
- [90] Declaration of Helsinki. (Serial en línea) 2004 (citada 24 noviembre 2004) (8 pantallas). Disponible en: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
- [91] Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Requisitos para la solicitud de autorización y modificación de ensayos clínicos. La Habana: CECMED; 2000.
- [92] Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Directrices sobre

- buenas prácticas clínicas. La Habana: CECMED; 2000.
- [93] Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Requerimientos para el manejo y uso de los productos en investigación en los ensayos clínicos y responsabilidades de las partes. La Habana: CECMED; 2000.
- [94] Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Directrices sobre buenas prácticas para la fabricación de productos farmacéuticos en investigación. La Habana: CECMED; 2002.
- [95] Organización Mundial de la Salud (OMS). Global program for vaccines and immunization. The WHO position paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. Wkly Epidemiol Rec 1998; 73: 64-8.
- [96] Campos J. Enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* serotipo b. Med Clin 1999; 112: 16-7.
- [97] Käyhty H, Peltola H, Karanko V, et al. The protective level of serum antibodies to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. J Infect Dis 1983; 147:1100.
- [98] Santosham M. Can *Haemophilus influenzae* type b disease be eliminated from the United States. J Pediatr 2000; 137: 295-8.
- [99] Fernandez J, Levine OS, Sanchez J, Balter S, LaClaire L, Feris J. Prevention of *Haemophilus influenzae* type b colonization by vaccination: correlation with serum anti-capsular IgG concentration. J Infect Dis 2000;182:1553-6.
- [100] Vega JM, Cebrián I, Alvarez-Guisasola V, Vega J. Aspectos medicolegales de la experimentación humana. Cuadernos de Bioética 4<sup>ta</sup>; 1996. p. 432-42.
- [101] V. Verez-Bencomo, V Fernández-Santana, Eugenio Hardy, Maria E Toledo, Maria C Rodríguez, Lazaro Heynngnezz, Arlene Rodríguez, Alberto Baly, Luis Herrera, Mabel Izquierdo, Annette Villar, Yury Valdés, Karelía Cosme, Mercedes L Deler, Manuel Montane, Ernesto Garcia, Alexis Ramos, Aristides Aguilar, Ernesto Medina, Gilda Toraño, Iván Sosa, Ibis Hernandez, Raydel Martínez, Alexis Muzachio, Ania Carmenates, Lourdes Costa, Felix Cardoso, Concepción Campa, Manuel Díaz, René Roy. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. Science 2004; 305: 522-25.

Recibido: 25 de diciembre de 2004

Aceptado: 20 de enero de 2005



**Tabla 1: Estudios clínicos que incluyeron el uso de la vacuna Quimi-Hib.**

No.	Nombre del estudio	Fecha de comienzo
1	Evaluación de la reactogenicidad de un candidato vacunal cubano contra el <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b en adultos sanos.	07.08.2001
2	Evaluación de la reactogenicidad de un candidato vacunal cubano contra el <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b en niños sanos de 4 y 5 años.	11.02.2002
3	Evaluación de la reactogenicidad de un candidato vacunal cubano adyuvado con fosfato de aluminio contra el <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b en adultos sanos.	05.03.2002
4	Evaluación de la reactogenicidad de un candidato vacunal cubano contra el <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b adyuvado y sin adyugar en lactantes sanos	22.04.2002
5	Evaluación de la seguridad e inmunogenicidad de un candidato vacunal cubano contra el <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b en niños sanos de 4 y 5 años.	20.05.2002
6	Evaluación de la inmunogenicidad y la reactogenicidad de un candidato vacunal cubano contra el <i>haemophilus influenzae</i> tipo b adyuvado y sin adyugar en lactantes sanos.	26.08.2002
7	Seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-PRP 12 meses después de la primovacunación contra Hib en niños sanos de 17 y 18 meses de edad y respuesta inmunológica ante la administración de una dosis de refuerzo de la vacuna cubana Quimi-Hib. Estudio abierto, no aleatorizado.	02.09.2003

## Trabajo Experimental

---

### *EVALUATION OF RESULTS DERIVED FROM THE IMPLEMENTATION OF A QUALITY ASSURANCE PROGRAM IN THE NATIONAL CONTROL LABORATORY OF CUBA*

MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Lic. Ana Lara Sterling, MSc. Ivette Abreu Nicot, Lic. Natacha Reyes Huerta, Lic. Ania Fernández de Castro Yanes, Tec. Mabel García Rodríguez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

#### **Abstract**

Testing laboratories should have appropriate tools in order to evaluate test, operator and Quality System performances as well as to ensure their test results. Our laboratory designed a Quality Assurance Program conformed by four elements: self-inspections, training review, collaborative studies and control charts. Following 3 years of implementation, we intended to evaluate these procedures to monitor its suitability. It was proposed a methodology for monitoring the impact of the Program. The successful results derived from the implementation of our Quality Assurance Program have shown the feasibility of our method for the quality control of vaccines and blood products that can be extended to any laboratory.

**Key words:** Quality assurance Program, laboratory performance

#### **Introduction**

Data from a testing laboratory not only needs to be consistent but to be accurate within defined variability, using acceptable methodology. The ISO-Guide 17025, a world's definitive standard for assuring the quality of data from a testing laboratory, recommends the implementation of a Quality Assurance Program so that it can be assured the validity of test results. For National Control Laboratories the introduction of Good Laboratory Practices and a Laboratory Quality System (LQS) is not only a requirement but also a necessity in order to ensure the efficacy, safety and

quality of vaccines and blood products [1-4].

Our Quality Assurance Program has four main components: self-inspections, training and data review, participation in collaborative studies and test monitoring using control charts.

Training and data review allows monitoring test and operators and identifies possible re-training needs. This can be undertaken defining three different methods: Method I (evaluation of the successful outcome of a test), Method II (evaluation of intra – assay variability) and Method III (evaluation of the variability between analysts). The analysis of blinded samples and the comparison of laboratories results in the framework of collaborative studies provide useful and reliable information about the reproducibility of analytical methods as well as the laboratory performance. Self-inspections are used in order to verify our LQS activities so that we could detect the deviations and make corrective actions. Its application allows to identify the advances reached and to monitor the effectiveness of the corrective actions too. In regard to Control Charts, this is a very recommended way for monitoring the test and reference materials performances.

In principle, we have implemented these tools for the quality control of vaccines but this experience can be extended to the quality control of other biological products released by the National Regulatory Authority like blood products. First, after 3 years of implementation, we are in good conditions for evaluating the impact of our Quality Assurance Program on the operators and laboratory performances.

The aim of this paper is to show how a laboratory can implement a Quality Assurance Program in an easy way and to evaluate its suitability for monitoring their results and performance.

## **Materials and Methods**

### ***Training and data review***

We selected one case from each method (I, II and III) and after we evaluated the impact of this procedure on the laboratory performance considering the non - valid test results in 3 years of implementation. In all cases, the vaccine samples were provided by manufacturers and already assayed and released by our laboratory.

One analyst was evaluated by Method I for Hepatitis B vaccine testing. He received blinded samples from 2 batches for performing the classical in vivo potency test in mice [5] and we defined the criteria of competence as the obtaining of a relative potency higher than 0.5. Besides, it was evaluated whether the coefficient of variation (CV) was within the expected range ( $\pm 50\%$ ) regarding the previous results. The test should accomplish with the linearity and parallelism criteria.

The second analyst was evaluated by Method II for the trivalent Polio vaccine (OPV). She performed two potency, identity and thermostability tests [6] in different days for the same blinded sample. We defined as criteria of

competence to get titres for the replicates within 0.5 log<sub>10</sub>. For considering the validity of results, the vaccines should accomplish the respective specifications ( $\geq 6.0$  for Polio I,  $\geq 5.0$  for Polio II and  $\geq 5.8$  for Polio III). Likewise, each test should accomplish some criteria such as clearly delineated virus cytopathic effect, ability to perform the cell culture technique with no contamination and to get healthy monolayers.

The last analyst was evaluated by Method III for Hepatitis B, but performing an in vitro potency test developed in our laboratory [5]. The two operators evaluated three blinded samples in three different days and the criteria were that the variability between evaluated and experienced operators should be within the expected range ( $\pm 20\%$ ). Additionally, every valid assay should accomplish with the linearity and parallelism of dose response curves and the relative potency of each vaccine should be  $\geq 0.75$  of the standard (in house standard).

### ***Self - inspections***

Every year we make a self – inspection plan involving the main LQS activities like equipment and measurement traceability, handling of test items, reference materials, records, test methods, procedures among others. To date we have performed eight routines and five follow-up inspections according to this new National Control Authority inspection system based on WHO recommendations. For these kinds of activities, we used checklists and working lists for recording deviations and corrective actions. The impact of self - inspections was evaluated by analysis of the deviation reduction for each LQS activity.

### ***Collaborative studies***

We have been involved in two collaborative studies. We developed a collaborative study concerning of the in vitro potency test for Hepatitis B vaccine in order to demonstrate that our test could monitor the manufacturer's results. We sent to the Cuban manufacturer (CIGB) blinded samples of 10 batches and evaluated whether there was a significant correlation between both methods. For in vitro potency test CIGB and our lab used a method based on the same principle (a previous neutralization step and a subsequent ELISA for determining anti-HbsAg antibodies), but CIGB used their own reagents [7] meanwhile we used anti-HbsAg Hepanostika kit from Organon Teknika [5].

The other collaborative study was a part of the study (Phase 2) for the characterization of the candidate WHO reference panel for Hepatitis B surface antigen (HbsAg). The Phase 1 was performed by the Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits by calibration of the most concentrated panel member against for the First International Standard for HbsAg (NIBSC Code 80/549). The aim of this study was to characterize the reference panel in a wide range of HbsAg detection kits, which are in use around the world. The panel members sent by NIBSC were reconstituted in 1 mL distilled water as described in the study Protocol. These members were treated as typical test samples and assayed in duplicate as recommended by the manufacturer [7]. The testing was repeated on three separated days. Raw data were returned to NIBSC for processing.

### ***Control Charts***

We established a Control Chart for the Hepatitis B vaccine standard (a Regional

Standard) used for in vitro potency test. We selected ED 50 of the standard as a parameter for monitoring the performance of the potency. The Control Chart was built using Microsoft Excel and we analysed the results following the Finney's method [8].

### **Results and Discussion**

The implementation of a Quality Assurance Program is a vital step to ensure the reliability of test results.

As shown in Tables 1, 2 and 3, the evaluations performed were successful because all the criteria of competence were fulfilled. For Polio test, the difference between replicates for each vaccine component (including thermostability) was no longer than  $0.5 \log_{10}$  whereas for Hepatitis B test the variability between analysts was lower than 20% (CV=11.05%). In both cases, the results were within the expected range.

The impact of training and data review on the quality control testing is shown in Table 4. For Polio and Hepatitis B vaccines, we have performed 111 potency tests so far, and only the 1.8 % have resulted non-valid tests.

According to these results, it's evident training and data review is a powerful method for monitoring the operator performances and assuring the lab results.

As shown in Table 5 we have performed 15 self-inspections, including routine and follow up inspections. Analysis of Table 5 shows successful compliance of corrective actions for the majority of Quality System activities. In the case of equipment, the lower percent of compliance is due to the lack of resources to deal with the deviations detected. In general, this result is evidence of the capacity of self-inspections to identify deviations and take corrective actions. Self - inspections has

enabled our laboratory to deal swiftly and effectively with deviations revealed by internal audits undertaken by the Quality Assurance Department.

Fig. 1 and Tables 6 and 7 illustrate the results derived from the collaborative studies.

As shown in Fig. 1, there was a significant correlation between the in vitro method performed by CIGB and by our laboratory ( $r=0.96$ ,  $p<0.05$ ) in spite of differences in testing methods and in the relative experience of the two testing centres. This study demonstrated the reliability of our in vitro test to monitor the manufacturer's consistency, in agreement with the increasing role of alternative methods in control of biological products [9].

The Table 6 shows the results derived from the HbsAg collaborative study. For each sample, the recommended values were within the respective confidence intervals and each replicate was included in the confidence intervals from the other one. Besides, the negative values were below the cut - off, but our method could not detect the panel 5 as reactive.

Nonetheless, this result is in agreement with the results reported by other laboratories as shown in Table 7. From 21 laboratories collaborating in the study, at least nine performed ELISA for evaluating the samples. Our laboratory had a coincidence of 100 % for the samples 1, 2, 3 and 6, 88.9 % for the sample 4 (only one laboratory reported the sample as reactive) and more than 65 % for sample 5. The European National Control Laboratories (Phase 1) found the sample 5 as reactive, so the results could be accounted for differences in the sensitivity of antibodies used for the collaborative studies, mainly for laboratories from developing countries. Therefore, the participation in collaborative studies is another valuable

procedure for evaluating laboratory performance.

Fig. 2 shows the control chart monitoring the vaccine standard we used for Hepatitis B in vitro potency test. As all the acceptance criteria were fulfilled, we can consider that the standard and the test were kept under control as well.

### Conclusions

From the results discussed above we can conclude that the implementation of training and data review, self-inspection, collaborative studies and control charts conforming a Quality Assurance Program allows to monitor tests, operators and Quality System performance. We have also demonstrated that it is possible implementing this kind of programme in a fast, simple and accurate way. Undoubtedly, our Quality Assurance Program provides us tools in order to give accurate and reliable results for the quality control of vaccines and blood products and as a methodology is completely applicable to any laboratory.

### References

- [102] ECVAM News & Views. ATLA 1994; 22: 7-11.
- [103] Russell, W. The principles of human experimental techniques, in M.S.&Burch R.L. (ed). 238pp. London, UK: Methuen, 1959.
- [104] WHO Technical Report Series No. 882: Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products, pp. 31 44. Geneva, Switzerland: WHO, 1992.
- [105] NC ISO-IEC 17025. Quality System ISO-Guide for testing and calibration laboratories, 2000.
- [106] Chovel M.L., Reyes N: Validation of an in vitro potency test for Cuban Hepatitis B vaccine in the NCL. Development in Biologicals 2002; 111:307-315.
- [107] Manual of Laboratory Methods for Potency Testing of vaccines Used in the WHO Expanded Programme on Immunisation. WHO/VSQ197.04 1997. Geneva Switzerland: WHO, 1997: 59-64.

121 Trabajo experimental

- [108] Izquierdo M et al: Validation of an *in vitro* test for Hepatitis B vaccine. *Biotechnology* 2001; 18: 235-246.
- [109] Finney DJ. Control Charts, in Charles Griffin (ed.) and Company Limited: *Statistical Method in Biological Assay*. London, UK: 161-162, 1964.

- [110] Hendriksen CFM: Validation of Alternative Methods for the Potency Testing of Vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 31. *ATLA* 2001; 26:747-761.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Table 1. Evaluation by Method I (Hepatitis B in vivo test).**

Criteria of competence	Result	Evaluation
Relative potency $\geq 0.5$	Sample X=2.04	Pass CV (X) = 12 %
CV within the expected range ( $\pm 50\%$ ) of previous results	Sample Y=1.09	CV (Y) = 18 %

**Table 2. Evaluation by Method II (Polio test).**

Polio component	Titre (first day)	Titre (second day)	Evaluation
Polio I	P1: 6.67	P1: 6.61	Pass (P1>6.0)
Polio II	P2: 5.65	P2: 5.49	Pass (P2>5.0)
Polio III	P3: 6.11	P3: 6.05	Pass (P1>5.8)
Thermostability	Pt: 6.85	Pt: 6.75	Pass
Criteria of competence: Differences not higher than $\pm 0.5 \log 10$ .		Final Evaluation: Pass	

**Table 3. Evaluation by Method III (Hepatitis B in vitro test).**

Batch number	Replicates	Experienced operator	Trainee
070	1	1.436	1.410
	2	1.172	1.436
	3	1.255	1.264
072	1	1.844	1.716
	2	1.266	1.671
	3	1.441	1.395
062	1	2.216	1.925
	2	1.447	1.773
	3	1.582	1.472
CV= 11.05 %		Specification: < 20 %	

**Table 4. Evaluation of the impact of training and data review. The in vivo evaluation of Hepatitis B vaccine started in 2001.**

Vaccine tests	Non - valid tests	Number of tests by year			
		2000	2001	2002	2003
In vitro potency tests for Hepatitis B vaccine	1	5	25	10	8
In vivo potency tests for Hepatitis B vaccine	1	-	2	4	5
Potency, identity and thermostability test for Polio vaccine	0	10	22	5	15

**Table 5. Development of self-inspections.**

Quality System activities	Routine inspection	Follow up inspection	Compliance of corrective actions
Equipment	x	x	40 %
Documentation	x	x	70 %
Reference materials	x	x	100 %
Personnel	x	-	-
Test items	x	x	98%
Viral tests	x	x	100 %
Animal tests	x	x	70 %
Bacterial tests	x	x	98%

**Table 6. Results from the HbsAg collaborative study. The cut - off value was 0.135.**

Preparation	Result/Response		
	Replicate 1	Replicate 2	Recommended value
Panel 1	30.5 UI/ml (28.1-33.1)	29.7 UI/ml (27.1-32.6)	30 UI/ml
Panel 2	6.17 UI/ml (5.35-6.99)	6.65 UI/ml (5.79-7.52)	6.7 UI/ml
Panel 3	1.73 UI/ml (1.24-2.31)	1.60 UI/ml (1.13-2.17)	2.3 UI/ml
Panel 4	0.47 UI/ml (0.17-1.23)	0.42 UI/ml (0.13-1.26)	0.5 UI/ml
Panel 5	NR (non reactive)	NR	0.13 UI/ml
Panel 6	NR	NR	Negative control

**Table 7. Comparison with other laboratory results. R means reactive, NR means non reactive, NCL means National Control Laboratory.**

Kit	Panel member					
	1	2	3	4	5	6
ELISA	R	R	R	R	R/NR	NR
ELISA	R	R	R	R	NR	NR
ELISA	R	R	R	R	R	NR
ELISA	R	R	R	R	R/NR	NR
ELISA	R	R	R	R	NR	NR
ELISA	R	R	R	R	NR	NR
ELISA	R	R	R	NR	NR	NR
ELISA	R	R	R	R	NR	NR
ELISA (Cuban NCL)	R	R	R	R	NR	NR

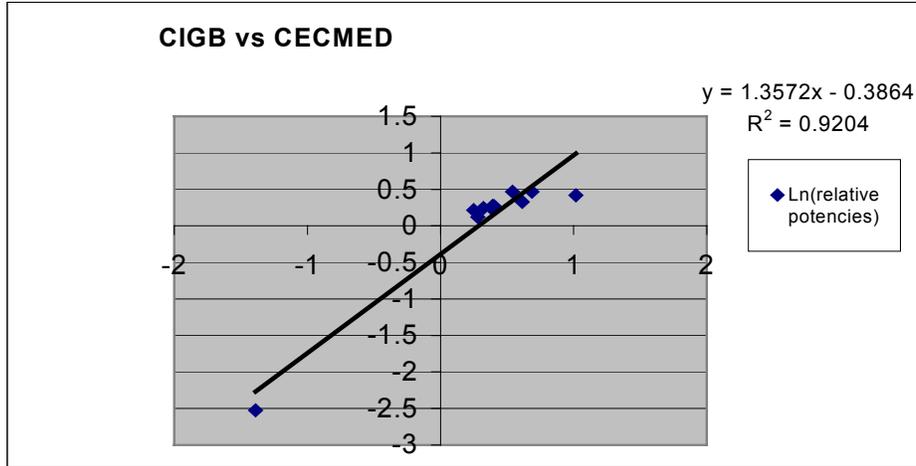


Fig. 1. Correlation with the manufacturer's method. The left point represent a sample treated to high temperatures for decreasing its relative potency. The rest of samples have acceptable relative potencies.

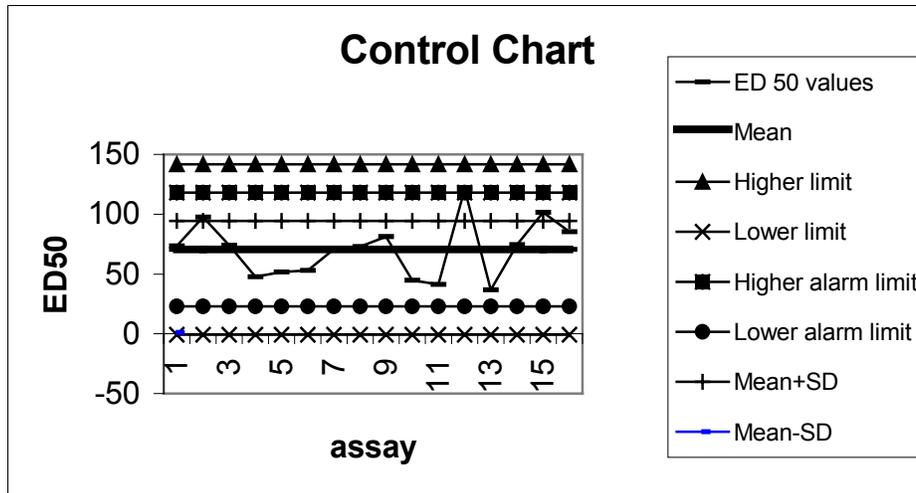


Fig. 2. Control Chart for Hepatitis B vaccine standard (in vitro test). The Regional Standard for Hepatitis B vaccine was used and monitored in our lab only during the validation of the in vitro potency test for this vaccine.

**ESTANDARIZACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOGENICIDAD DE VACUNAS CONTRA HAEMOPHILUS INFLUENZAE TIPO B (HIB) EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE LA CALIDAD**

MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Dr. Juan Miguel Figueroa Medina, Lic. Lidia Rosa Pérez Villavicencio, Téc. Vicente Perdomo Llamo

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

### Resumen

Las vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), han impactado significativamente la incidencia de las afecciones provocadas por este microorganismo. El control de este tipo de productos se basa en pruebas físico – químicas, dado que no ha sido posible desarrollar aún ensayos de inmunogenicidad relevantes para la liberación de lotes. Sin embargo, dicho ensayo debe mantenerse para demostrar la consistencia y significación biológica de los ensayos físico – químicos, en particular para productos novedosos como la vacuna cubana Quimi-Hib (primera obtenida por síntesis química a nivel global). Este trabajo, se propuso como objetivo principal, estandarizar e implementar el ensayo de inmunogenicidad para vacunas Hib en una especie que rindiera resultados consistentes, el conejo. Para ello se evaluaron parámetros relevantes como la robustez, la precisión y la especificidad, y se compararon los resultados obtenidos tras la implementación oficial del método con los del fabricante, que diseñó el método en cuestión. Todos los parámetros fueron evaluados como satisfactorios.

**Palabras claves:** *haemophilus influenzae*, estandarización, ensayo de inmunogenicidad y vacuna conjugada

### Introducción

El *Haemophilus influenzae* es un cocobacilo responsable de la mayor parte de los casos de meningitis bacterianas, algunas muy graves, en niños menores de 3 años. Es conocido que, aún cuando existen desde el punto de vista serológico 6 serotipos (del a al f), caracterizados por Margaret Pitman entre 1920 y 1930, el 95 % de las enfermedades invasivas asociadas

a *Haemophilus influenzae* corresponden al serotipo b [1-2].

Los estudios para el diseño de una vacuna eficaz comienzan a partir de 1944, cuando se estableció que la mayoría de los anticuerpos protectores contra Hib, en conejos, estaban dirigidos contra el polisacárido capsular tipo b y que los anticuerpos contra otras estructuras del microorganismo también podrían ser protectores. Luego, se descubrió que es el polisacárido o polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), dentro de la cápsula del tipo b, el antígeno que resulta inmunogénico. Esto fue reafirmado por Andersson, en 1972, al demostrar el poder protector de los anticuerpos anticapsulares y por Noxon, en 1974, al presentar un modelo animal para *Haemophilus influenzae* [3].

Todos estos estudios condujeron a la primera vacuna polisacáridica contra Hib descrita por Peltola y colaboradores en 1974, la cual fue licenciada en abril de 1985 en Estados Unidos. Esta vacuna, basada en PRP, resultó completamente inefectiva antes de la edad de 18 meses, lo que representó una dificultad importante para la vacunación rutinaria, pues los datos epidemiológicos indicaban una clara necesidad de proteger a los infantes antes del sexto mes de vida [2-3]. Las limitaciones del polisacárido capsular finalmente se superaron cuando Schneerson y Robbins adsorbieron PRP a toxoides diftéricos, y produjeron así la primera vacuna conjugada polisacáridica,

la cual era más inmunogénica y efectiva que la anterior. Posteriormente, se desarrollaron nuevas vacunas empleando como agente de conjugación una proteína no tóxica derivada de una cepa mutante de *C. diphtheriae*, un complejo proteínico de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, o toxoide tetánico. Estas nuevas vacunas conjugadas resultaron muy inmunogénicas en infantes y niños pudiendo administrarse a niños de hasta tres meses de edad [2,4,5].

Una nueva alternativa al desarrollo de inmunógenos humanos acaba de ser puesta a disposición de la ciencia moderna por el Centro de Estudios de Antígenos Sintéticos de la Universidad de la Habana, con la colaboración del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), con la elaboración, por primera vez en el mundo, de una vacuna de antígeno sintético. El reciente preparado contra el *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (conjugado a toxoide tetánico), demostró ser tan eficaz como las vacunas conjugadas ya existentes. El primer millón de dosis del nuevo inmunógeno está en manos del sistema cubano de salud y dará cobertura a la vacunación en el país a partir de este año 2004, como sustituto de la vacuna que se importaba (Vaxem-Hib).

Desde el punto de vista de control de calidad, la inmunogenicidad en animales de este tipo de vacunas, en función de la determinación de la potencia o actividad de las mismas, debería resultar un aspecto vital en función de la liberación de lotes y el monitoreo de la consistencia de fabricación. Por principio, los ensayos de potencia han sido diseñados para medir la habilidad de una vacuna para proteger contra el desafío inducido por el componente activo responsable de la patogenicidad, y deben ser capaces de distinguir vacunas de baja potencia que

pueden haber mostrado inmunogenicidad reducida en humanos [6].

Sin embargo, no existe hasta el momento ningún método de inmunogenicidad o potencia que pueda proporcionar resultados que posean un valor predictivo de la eficacia clínica. La inmunogenicidad y las propiedades dependientes de células T de las vacunas conjugadas Hib pueden ser evaluadas en ratones y en conejos, sin embargo, ninguno de estos métodos se correlaciona con las propiedades inmunológicas de estas vacunas en niños. De este modo, se considera que los estudios de inmunogenicidad en animales resultan útiles para el proceso de desarrollo de la vacuna, pero no así para el control del producto ya establecido [7]. Algunas interesantes investigaciones se realizan en el mundo en varias especies animales (ratas, curieles) [8] con resultados promisorios, pero ninguna ha posibilitado aún el establecimiento de un ensayo biológico para la determinación de potencia de vacunas Hib, que pueda ser incorporado como ensayo relevante para la liberación de lotes de este producto.

En su lugar, se plantea que la liberación de lotes deberá centrarse en los resultados de análisis físico – químicos (cromatografía de exclusión molecular, determinación de PRP libre, entre otros), para monitorear la consistencia de la calidad del polisacárido, la proteína *carrier* y el granel conjugado. De hecho, si los resultados de los ensayos relativos a la pureza, tamaño molecular, composición y dosis, confirman la consistencia de producción y la conformidad con las especificaciones establecidas en lotes utilizados para probar eficacia y seguridad en ensayos clínicos, entonces ellos darán alguna indicación, si bien no una certeza definitiva, de la habilidad de la vacuna para producir una respuesta inmune protectora [7].

No obstante, para productos nuevos y novedosos, la evaluación de inmunogenicidad no debe ser excluida hasta tanto se establezca la significación biológica de los ensayos físico-químicos y como una medida de la consistencia de fabricación de este producto. Además, los ensayos biológicos como éste, si bien no resultan relevantes para la liberación propiamente dicha, sí lo son para estudios de estabilidad, vigilancia postcomercialización y evaluación del componente Hib en vacunas combinadas. Para que tales ensayos puedan ser utilizados por los laboratorios de la Autoridad Reguladora de Medicamentos, se requiere de su previa validación y/o estandarización a fin de asegurar que estos métodos analíticos proporcionen resultados confiables durante los procesos de evaluación para garantizar calidad, seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos en general.

Tomando en consideración estos antecedentes, nuestro trabajo se propuso como objetivo fundamental estandarizar e implementar un ensayo de Inmunogenicidad para vacunas Hib en nuestras condiciones, particularmente para evaluar la vacuna Quimi-Hib.

## **Materiales y Métodos**

### ***Muestras***

Se utilizaron muestras de vacuna contra Hib de 2 fabricantes diferentes: Vaxem-Hib, procedente de Chiron Vaccines (vacuna de polisacárido, acoplada a toxoide diftérico mutante CRM197) y Quimi-Hib, producida por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Centro de Estudios de Antígenos Sintéticos de la Universidad de la Habana (LAGS) (vacuna de polisacárido, obtenido por síntesis

química, conjugado a toxoide tetánico). En total, se trabajó con 2 lotes de vacuna Vaxem-Hib y 9 lotes de vacuna Quimi-Hib.

### ***Patrones y Reactivos***

Se utilizó un suero control positivo del CIGB, con asignación de 20 mg/mL en unidades arbitrarias.

Los reactivos biológicos para el montaje del ELISA se adquirieron de fabricantes reconocidos y certificados (SIGMA y OXOID). Todos los reactivos químicos utilizados en los inmunoensayos son de calidad puro para análisis e igualmente fueron adquiridos de proveedores certificados como Merck y Riedel de Hæn.

### ***Descripción del ensayo de Inmunogenicidad para determinación de anticuerpos anti-PRP producto de la inmunización con vacunas Hib en conejos***

Se basa en la capacidad de los animales (conejos) de levantar anticuerpos específicos anti - PRP al ser inoculados con dosis apropiadas de vacuna Hib, y la determinación de la seroconversión, se realiza por un ELISA de determinación de anticuerpos anti-PRP.

Las muestras de vacuna Hib son inoculadas a razón de 5 conejos F1 por lote, según el esquema más apropiado para cada tipo de vacuna. Una vez concluido dicho esquema, los conejos son desangrados por vía axilar y los sueros son obtenidos por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos. Los sueros son conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Dichos sueros, son analizados por ELISA. Para ello se recubre una placa microelisa de 96 pocillos NUNC Maxisorp (de fondo plano), con PRP acoplado a albúmina de suero humano en PBS (concentración final

de 1 µg/mL), a razón de 100 µL por pocillo. Luego la placa se incuba 1 hora y media a 37 °C y se realizan 3 lavados con tampón de lavado (PBS + Tween 20 1%). Posteriormente, se añade como bloqueo una solución de albúmina de suero bovino al 1% en agua destilada (100 µL por pocillo) y se incuba a 37 °C durante media hora. Concluido este tiempo, se aplican los sueros de ensayo (más el control positivo), y controles negativos (suero de conejos obtenido antes de inmunizar), diluidos 1/50 en una solución de PBS + albúmina de suero bovino + Tween 20 + EDTA sal disódica, incubándose las mismas durante hora y media a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se lava y se aplica el conjugado de IgG anti – conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (100 µL por pocillo), a una dilución 1/10000 en el mismo diluyente de muestra. La placa, se incuba nuevamente una hora a 37 °C. Después del correspondiente lavado se añade como sustrato ortofenilendiamina (OPD) (100 µL por pocillo), en tampón fosfato citrato + peróxido de hidrógeno y se incuba a temperatura ambiente. Media hora más tarde, la reacción se detiene con solución de ácido sulfúrico 2M (50 µL por pocillo) (hay un cambio de coloración de amarillo a naranja – marrón), y la absorbancia de los pocillos se lee a 492 nm en un lector de placas. Los sueros fueron considerados positivos de anticuerpos anti – PRP si las absorbancias de los sueros de ensayo son superiores a la suma de la media + 2 veces la desviación estándar de las absorbancias de los controles negativos [9].

El porcentaje de seroconversión se calcula por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de seroconvertidos} = N_i / N \times 100$$

N<sub>i</sub>: cantidad de conejos seroconvertidos por lote

N: cantidad total de conejos utilizados para un lote

### ***Evaluación y estandarización del ensayo de Inmunogenicidad en conejos.***

Para la evaluación del ensayo de Inmunogenicidad de vacunas Hib en conejos, transferido del CIGB a nuestro laboratorio, se utilizaron 2 lotes de la vacuna Vaxem-Hib, 0721 y 0831 (en el momento de la evaluación no contábamos con producción de vacuna Quimi-Hib). Ambas muestras, fueron evaluadas bajo 2 variantes diferentes como se muestra a continuación:

- El método del CIGB (I): Se utilizaron 5 conejos blancos de Nueva Zelandia por lote, con inoculación de 0.5 mL por animal a los 0 y a los 14 días y desangrado a los 21. Este procedimiento está más bien dirigido a monitorear la respuesta inmunológica primaria.
- El método del NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, UK) (II): Se utilizó el mismo número de animales y dosis idénticos, pero con esquema de inoculación a los 0 y 28 días y desangrado a los 42 días. Este procedimiento está fundamentalmente dirigido a monitorear la respuesta inmunológica secundaria.

Para la estandarización se evaluaron los siguientes parámetros:

- Sensibilidad/Especificidad: Se determinó si los métodos eran capaces de generar diferentes respuestas sobre la base de que se estaba evaluando una vacuna conjugada a CRM 197 bajo esquemas diferentes. Además, se evaluó si existía un sesgo en las respuestas de controles positivos (suero anti-PRP de conejo suministrado por el CIGB), controles negativos (suero de conejo obtenido en nuestro Vivario antes de la

inmunización), y blancos (diluyente de muestra).

- **Robustez:** Se evaluó la influencia de algunos factores como el impacto de la preparación de algunas soluciones (PBS, diluyente de muestra), el factor de dilución de los sueros y la utilización de 2 lotes diferentes de conjugado (aunque del mismo proveedor), así como de 2 lotes PRP para recubrimiento en el ELISA, de diferentes proveedores (en el caso del recubrimiento de LAGS, el PRP es obtenido por vía sintética). Para cada factor se montaron 4 ensayos independientes.
- **Repetibilidad del ELISA:** Se ensayaron los mismos sueros en 2 días diferentes por el mismo analista.
- **Precisión intermedia:** Fue realizado en una fase posterior a la determinación del resto de los parámetros. Se ensayaron los lotes en días diferentes por 2 analistas. Para la evaluación de este parámetro se evaluaron tanto lotes de Vaxem (2 lotes), como de Quimi-Hib (4 lotes).

En este experimento se determinó si existían diferencias significativas entre muestras controles y blancos, y en entre los porcentajes de seroconversión obtenidos en los estudios de precisión.

***Implementación de métodos para el registro y la liberación de lotes de vacuna Quimi-Hib.***

Se ensayaron los 10 primeros lotes de la producción de vacuna Quimi-Hib por el ensayo de Inmunogenicidad en conejos. Los resultados del laboratorio fueron monitoreados contra los obtenidos por el fabricante, y fueron utilizados para los procesos de registro de la vacuna, así como para la liberación de lotes de la misma en función de monitorear la consistencia del proceso.

## Resultados

### *Evaluación y estandarización de la Inmunogenicidad en conejos*

La Tabla 1, “Desempeño de Vaxem – Hib por Inmunogenicidad en conejos” refleja que el método es capaz de detectar diferentes respuestas ante esquemas diversos.

Por otra parte, en la Fig. 1, puede apreciarse que hay diferencias significativas (por t student), en las absorbancias medias entre los controles negativos (definido en el gráfico sobre la base del valor de corte) y las muestras positivas de anticuerpo.

Mientras tanto, no hubo diferencia entre el blanco (diluyente de muestra) y el valor de corte.

Los resultados del estudio de Robustez, como parte importante del diseño de la estandarización del método, se exponen a continuación. La influencia sobre el método del factor de dilución de los sueros puede apreciarse en la Tabla 2. De ella, se deriva que el factor de dilución óptimo de los sueros de conejos para la determinación de inmunogenicidad por seroconversión es 1/50.

En la Tabla 3, se refleja la influencia de la preparación y composición de algunas soluciones, particularmente el diluyente de muestra, en los resultados obtenidos por Inmunogenicidad. Como puede apreciarse, la no presencia de sal disódica de EDTA o su presencia en forma de ácido, afecta la evaluación por ELISA de los sueros Hib de conejos.

También, en la Tabla 4, se presenta la influencia de otro factor (el lote de conjugado y su dilución), sobre los resultados de la Inmunogenicidad en conejos:

Del estudio anterior se derivó que podían utilizarse cualquiera de los 2 lotes de

conjugado, seleccionándose la dilución 1/10000 como óptima.

Por otra parte, la Fig. 2 muestra la influencia del lote y proveedor del recubrimiento para el ELISA (PRP-albúmina de suero humano). Como resulta evidente de su análisis, no existieron diferencias entre el recubrimiento suministrado por el NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) y el diseñado en el Centro de Estudios de Antígenos Sintéticos de la Universidad de la Habana. La dilución óptima resultó ser 1 µg/mL.

Por otra parte, la Tabla 5, muestra que no existen diferencias significativas en los resultados derivados del estudio de repetibilidad.

De igual modo, en la Tabla 6, se reflejan los resultados del estudio de precisión intermedia, donde tampoco se apreciaron diferencias en los resultados obtenidos.

### *Implementación de ensayos para la liberación de lotes de vacunas Hib*

La Fig. 3, representa el comportamiento de la Inmunogenicidad en conejos (seroconversión), en ambas instituciones para los primeros lotes de fabricación de vacuna Quimi-Hib.

Como es apreciable, no existen diferencias notables en los resultados de ambas instituciones, en lo referente a los ensayos biológicos utilizados para la liberación de lotes de esta vacuna.

## Discusión

Tomando en cuenta que la OMS recomienda, dentro de las 6 funciones básicas de un Sistema Regulador de vacunas eficaz, que los ensayos de calidad de los productores sean verificados por los LNC a través de ensayos (antes de la liberación de lotes), podrá comprenderse la importancia de desarrollar métodos

rápidos, exactos y lo más sencillos posibles, que contribuyan al monitoreo de la consistencia de producción de las vacunas y al dinamismo de la propia actividad reguladora. Por otra parte, es de vital importancia para el CECMED fortalecer la capacidad analítica de su Laboratorio de Biológicos, lo cual aparece reseñado en la Política Farmacéutica Nacional, en aras de incrementar las exigencias de calidad para productos de tanto impacto como las vacunas.

Para el caso específico de la vacuna Hib, resultaba esencial la evaluación de un ensayo de inmunogenicidad confiable y reproducible que pudiese ser utilizado, si no para la liberación de lotes, al menos para actividades relativas al monitoreo de la consistencia de fabricación y la estabilidad. Para el caso de la vacuna Quimi – Hib esto adquiere una mayor connotación tomando en consideración que se trata de la primera vacuna contra el *Haemophilus influenzae* tipo b que se desarrolla en nuestro país y al hecho trascendental de ser la primera vacuna obtenida por vía sintética en el mundo.

En trabajos anteriores, se había demostrado que, tanto la vacuna Vaxem, como la Quimi-Hib, respondían en el modelo ratón, sin embargo, dicha respuesta resultaba inconsistente [10-11]. En cambio, la respuesta inmunológica que se producía en el conejo constituía un medidor más confiable de la actividad biológica de este tipo de vacunas. De hecho, éste es el ensayo seleccionado por el fabricante para desde el punto de vista biológico monitorear consistencia.

Para estandarizar el método, en primer lugar se demostró que el éste es capaz de detectar respuestas ante esquemas diversos. Se esperaba que la vacuna Vaxem mostrara en el esquema 0, 28 y 42 días (método II), una respuesta superior a

la exhibida bajo el esquema 0, 14 y 21 (típico de vacunas Hib-TT). De hecho esto fue así para el lote 0731 (ver Tabla 1); sin embargo, el lote 0831 mostró un comportamiento similar frente a ambos esquemas, lo cual suele pasar para lotes con capacidad inmunogénica elevada. En cuanto a su especificidad, pudo demostrarse (Fig. 1), que las muestras que seroconvierten poseen una absorbancia que resulta al menos 4 veces superior a la mostrada por los controles negativos, en tanto no existieron diferencias significativas entre el valor de corte (establecido sobre la media de los controles negativos) y la media de los blancos.

El estudio de Robustez realizado, como parte de la estandarización de este método en conejos, arrojó que tanto el factor de dilución como la composición del diluyente de muestra tienen influencia en el desempeño del método. En el caso del factor de dilución (ver Tabla 2), se observó que los sueros debían ser diluidos al menos 1/50, dilución que fue seleccionada como óptima partiendo que en la 1/100 se obtuvo el mismo resultado, y que al utilizarlos sin diluir, se obtuvieron respuestas inespecíficas como la del método I, no representativas de la respuesta anti-PRP que produjo dicha muestra. Con respecto a la composición del diluyente, se pudo apreciar en la Tabla 3, que la no presencia de la sal disódica de EDTA produjo una reducción notable en la seroconversión.

En cambio, el lote de conjugado y las diluciones ensayadas (1/5000 y 1/10000) no tuvieron influencia en el desempeño del método (ver Tabla 4). De igual forma se evaluaron diferentes concentraciones de recubrimiento y si el comportamiento del recubrimiento utilizado por nosotros (producido por LAGS), resultaba similar a

un recubrimiento empleado internacionalmente (fabricado y suministrado por el NIBSC). En la Fig. 2 se muestra que no hubo diferencias significativas entre los recubrimientos y que la concentración óptima resultó ser en ambos casos 1 µg/mL, pues a partir de ella se saturó la respuesta (valores de absorbancia).

En cuanto a la evaluación de la precisión del método, no existieron diferencias significativas en los análisis intraensayo e interensayo (incluyendo la participación de 2 analistas en 2 días diferentes). Por tanto, la estandarización del método puede considerarse satisfactoria partiendo de que se cumplieron los criterios de aceptación establecidos para los parámetros seleccionados.

La Fig. 3, nos brinda un indicador del comportamiento de nuestro ensayo, una vez adoptado como oficial, con respecto a los resultados obtenidos por el fabricante, pudiéndose demostrar que no existen diferencias significativas en las tendencias de los ensayos monitoreados. Puede llamar la atención que el fabricante obtuvo 100 % de seroconversión para todos los lotes evaluados, en cambio, para los 4 primeros lotes, nuestro laboratorio obtuvo porcentajes de seroconversión que estuvieron entre el 80 y el 100 %. Este es un resultado que consideramos lógico, pues el método estará siempre influenciado por el lote de animales utilizado, la base para la selección del valor de corte de la prueba y por las propias limitaciones del método; no debe olvidarse que se trata de un ensayo de seroconversión con cinco animales por lote, que implica una reducción en la seroconversión del 20 % (del 100 al 80 %), si uno sólo de los animales exhibe una absorbancia por debajo del valor de corte. Consideramos que lo más importante en

este caso es que no existieron diferencias significativas entre los resultados de ambos laboratorios y que el nivel de aceptación de los lotes de Quimi-Hib fue idéntico. Por otra parte, algunos de los lotes de vacuna que mostraron seroconversiones inferiores al 100 % fueron reensayados posteriormente y exhibieron seroconversiones máximas. El resultado de este estudio de monitoreo resultó muy importante para nosotros porque constituye una prueba más del adecuado proceso de estandarización del método analítico en nuestro laboratorio y proporciona una herramienta más que contribuye a la demostración de consistencia del proceso de fabricación de la vacuna Quimi-Hib.

#### Referencias Bibliográficas

- [111] Rodríguez S. Impacto de la vacunación contra *Haemophilus influenzae* tipo *b* y valoración de algunos factores de riesgos en la mortalidad por meningoencefalitis por este agente en Cuba. Tesis de Maestría en Epidemiología. Ciudad de la Habana: IPK.; enero 2001.
- [112] Aventis Pasteur. *Haemophilus Influenzae* tipo *b*. Disponible en [http://www.aventispasteurmex.com/vacunas\\_hib.htm](http://www.aventispasteurmex.com/vacunas_hib.htm).
- [113] Aventis Pasteur. *Haemophilus influenzae* tipo *b*. Disponible en [http://www.avetispasteurmex.com/enfermedad\\_hib.htm](http://www.avetispasteurmex.com/enfermedad_hib.htm).
- [114] Plotkin S A; Orenstein WA. Vaccines. 3rd ed. Philadelphia (USA):W.B. Saunders Company; 1999. p184- 207.

- [115] Asociación Española de Pediatría. Vacunas frente a las infecciones invasoras por *Haemophilus influenzae tipo b*. Manual de vacunas en pediatría. 2da ed.2001; 196-211.
- [116] OPS. La vacunación contra el *Haemophilus influenzae tipo b*. Boletín informativo del programa ampliado de inmunización en las Américas 1998; 4: 3-4.
- [117] Breukels MA,Rijkers GT, Voorhorst O, Zegers MM. BJM 1999. Regulatory T- Cells in the Antibody Response to *Haemophilus influenzae type b* Polysaccharide. Infect.Immun. 67: 789-93.
- [118] Gómez LP, Cabrera R. Vacunas contra el *Haemophilus influenzae tipo b*: Presente, pasado y futuro. Min. Salud Pública de México. Número especial (Enfermedades Infecciosas) 1992; 34(3): 274-86.
- [119] Procedimiento Normalizado de Operación del CIGB “Evaluación de Inmunogenicidad en conejos”.
- [120] Von Hunolstein C y cols. Synthetic oligodeoxynucleotide containing CpG motif induces an anti-polysaccharide type 1-like immune response after immunization of mice with Hib conjugate vaccine. International Immunology 2000; Vol. 12, No. 3: 295-303.
- [121] Dossier de Autorización de Ensayo Clínico de vacuna Quimi-Hib, Cuba. 2002.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1 Desempeño de Vaxem – Hib por Inmunogenicidad en conejos.**

Muestra	Método	% de seroconversión.
Lote 0721	I	10
Lote 0721	II	60
Lote 0831	I	100
Lote 0831	II	100

**Tabla 2 Influencia del factor de dilución.**

Dilución de suero	Método	% de seroconversión	Aceptación
Sin diluir	I	80 %	Cumple
1/50	I	20 %	No cumple
1/100	I	20 %	No cumple
Sin diluir	II	60 %	Cumple
1/50	II	60 %	Cumple
1/100	II	60 %	Cumple

**Tabla 3 Influencia de la sal de EDTA en el desempeño del método.**

Lote (Método)	Composición del diluyente	% de seroconversión	Aceptación
0721 (II)	Tampón + sal EDTA	60 %	Cumple
0721 (II)	Tampón - sal EDTA	0 %	No cumple
0831 (I)	Tampón + sal EDTA	100 %	Cumple
0831 (I)	Tampón - sal EDTA	0 %	No Cumple

**Tabla 4 Influencia del lote de Conjugado y su dilución en el desempeño del método.**

Lote (método)	Lote de Conjugado (dilución)	% de seroconversión	Aceptación
0721 (I)	Lote 1 (1/10000)	10 %	No Cumple
0721 (I)	Lote 1 (1/5000)	10 %	No Cumple
0721 (I)	Lote 2 (1/10000)	10 %	No Cumple
0721 (I)	Lote 2 (1/5000)	10 %	No Cumple
0721 (II)	Lote 1 (1/10000)	60 %	Cumple
0721 (II)	Lote 1 (1/5000)	60 %	Cumple
0721 (II)	Lote 2 (1/10000)	60 %	Cumple
0721 (II)	Lote 2 (1/5000)	60 %	Cumple

**Tabla 5 Resultados del estudio de Repetibilidad.**

Lote	Dilución	Método	Fecha	% de seroconversión	Diferencia significativa
0721	Sin diluir	I	2003-10-17	80 %	No

## 136 Trabajo experimental

0721	Sin diluir	I	2003-10-31	100 %	
0721	1/50	I	2003-10-17	20 %	No
0721	1/50	I	2003-10-31	10 %	
0721	Sin diluir	II	2003-10-17	60 %	No
0721	Sin diluir	II	2003-10-31	80 %	
0721	1/50	II	2003-10-17	60 %	No
0721	1/50	II	2003-10-31	60 %	
0831	Sin diluir	I	2003-10-31	100 %	No
0831	Sin diluir	I	2003-11-19	100 %	
0831	1/50	I	2003-10-31	100 %	No
0831	1/50	I	2003-11-19	100 %	
0831	Sin diluir	II	2003-10-31	100 %	No
0831	Sin diluir	II	2003-11-19	100 %	
0831	1/50	II	2003-10-31	100 %	No
0831	1/50	II	2003-11-19	100 %	

---

**Tabla 6 Resultados del estudio de Precisión intermedia.**


---

Lote	Analista 1	Fecha	Analista 2	Fecha	Diferencia significativa
0721	60 %	2003-12-17	60 %	2004-01-21	No
0831	100 %	2003-12-17	100 %	2004-01-21	No
101	60 %	2003-12-17	60 %	2004-01-21	No
201	100 %	2003-12-17	100 %	2004-01-21	No
301	100 %	2003-12-17	100 %	2004-01-21	No
401	100 %	2003-12-17	100 %	2004-01-21	No
501	100 %	2003-12-17	100 %	2004-01-21	No

---

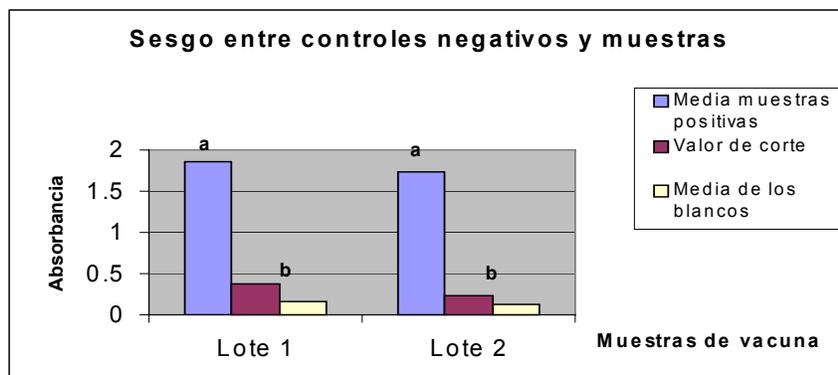


Fig. 1. Sesgo entre controles negativos y muestras para la Inmunogenicidad Hib en conejos.

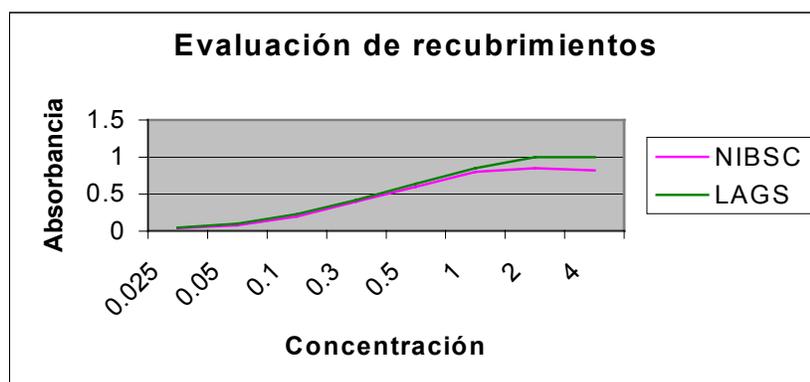


Fig. 2. Influencia del lote de recubrimiento en el desempeño del método.

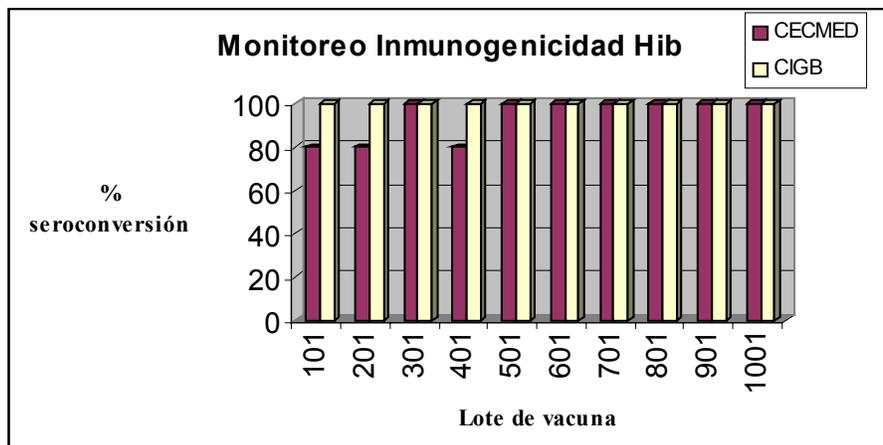


Fig. 3. Monitoreo de la Inmunogenicidad Hib CIGB – CECMED.

***EVALUACIÓN DE LOTES DE VACUNA ANTIPOLIOMIELÍTICA ORAL DE IMPORTACIÓN MEDIANTE LOS ENSAYOS DE POTENCIA, IDENTIDAD Y TERMOESTABILIDAD***

MSc Ivette Abreu, Tec. Mabel García Lic Ana Lara, Lic Ania Fernández, MSc. Mario Landys Chovel Cuervo, Lic Natacha Reyes, Dra Diadelys Remírez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)

### **Resumen**

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los primeros lotes de vacuna antipoliomielítica oral mediante los ensayos de potencia, identidad y termoestabilidad. En todos los casos analizados se cumplieron los criterios de aceptación del ensayo y los límites de aprobación de las muestras, ya que la potencia fue mayor de  $10^{6.0}$  DICC<sub>50</sub>/ dosis para polio 1, de  $10^{5.0}$  DICC<sub>50</sub>/ dosis para polio 2 y de  $10^{5.8}$  DICC<sub>50</sub>/ dosis para polio 3. De los tres componentes de la vacuna, la pérdida mayor de título correspondió al componente polio 3, lo que ha sido reportado con anterioridad en la literatura. En el caso del ensayo de termoestabilidad, se obtuvieron diferencias menores de 0.5 log para los tres lotes, lo que está de acuerdo con los requerimientos internacionales.

**Palabras claves:** vacuna antipoliomielítica oral, control de calidad, potencia, identidad, termoestabilidad, efecto citopático.

### **Introducción**

La poliomiелitis puede ser la segunda enfermedad erradicada en el mundo. No obstante, y a pesar de los éxitos alcanzados en esta temática, no debe disminuir el estado de alerta en los países de América que han logrado interrumpir la circulación del virus salvaje [1]. El gran intercambio internacional de viajeros y la rapidez con que el mismo se produce en la actualidad, hace factible la reintroducción del agente etiológico desde aquellos países donde todavía se mantiene la enfermedad. Es por ello que los programas de vacunación deben mantenerse mientras este peligro continúe vigente [2].

Para la prevención y control de la enfermedad, Cuba, lleva a cabo un esquema de vacunación único que consiste en aplicar dos dosis de la vacuna antipoliomielítica oral (OPV) a niños menores de tres años y una reactivación a niños de 9 años [3]. La primera campaña de vacunación efectuada en el año 1962, en Cuba, disminuyó el número de casos de poliomiелitis parálitica de 342 (1961) a 46 (enero - mayo, 1962). A partir del mes de junio de 1962, la enfermedad fue erradicada en el país y desde 1963, se interrumpió la circulación del poliovirus salvaje [4]. Para las campañas de vacunación se importan anualmente entre 20000 y 30 000 dosis de OPV.

Existen varios factores para garantizar el éxito de la campaña de vacunación que involucran a diferentes entidades del Ministerio de Salud Pública. Como Autoridad Nacional Reguladora de medicamentos, el CECMED, es responsable de efectuar la liberación de los lotes de OPV que se importan en el país, de acuerdo al cumplimiento de los requerimientos internacionales para este producto y de realizar los ensayos de control de calidad de la vacuna para comprobar que se cumplen los estándares de calidad establecidos en el Programa Ampliado de Inmunización (PAI) [5].

A partir del año 2002, se estandarizó en el laboratorio de control biológico del CECMED, el ensayo de potencia, identidad y termoestabilidad de la OPV.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los primeros lotes de vacuna OPV, que fueron liberados por la Autoridad Reguladora teniendo en cuenta, además de la revisión de la documentación presentada por los fabricantes, los ensayos de control de la calidad de este producto biológico.

### **Materiales y Métodos**

Se evaluaron tres lotes de vacuna antipoliomielítica oral, procedentes de la firma Aventis Pasteur, con las especificaciones mostradas en la Tabla 1. Estos lotes se emplearon en las campañas de vacunación de los años 2003 y 2004, efectuadas en los meses de febrero y abril, de acuerdo al esquema de vacunación cubano.

Como material de referencia se utilizó el lote U 6408, procedente de la firma Aventis Pasteur, que fue caracterizado en el laboratorio. Este material de trabajo fue calibrado contra el el Primer Patrón Internacional de Vacuna viva atenuada contra poliovirus (Sabin) con las siguientes especificaciones: No de lote: 85/659, codificación: Vpo/60/95. Los límites establecidos para este lote son para el componente polio 1 (6.19-6.79), polio 2 (5.41-5.82) y polio 3 (5.94 - 6.28) y en el caso de la vacuna total (6.60-7.19) y en termoestabilidad (6.29-6.87). El patrón se mantuvo almacenado a -70° C hasta su uso.

Se emplearon las siguientes las mezclas de anticuerpos monoclonales (AcM): 425 (neutraliza poliovirus tipo 1), 267 (neutraliza poliovirus tipo 2) y 495 (neutraliza poliovirus tipo 3). Los AcMs fueron diluidos (1/10), en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 4%. Posteriormente, se prepararon las mezclas de anticuerpos

(polio 1+ 2, polio 1+ 3 y polio 2+3) a V/V y se conservaron a -70° C hasta su uso.

Como sistema celular se empleó la línea celular transformada, de origen tumoral Hep 2 C, variante Cincinnatti, derivada de carcinoma laríngeo humano. Esta línea integra el banco celular de trabajo del laboratorio y la suspensión fue usada a una concentración de 200 000 células /ml y en el rango de 1-15 pases [6].

Las vacuna de referencia, anticuerpos monoclonales, y la línea celular fueron suministradas por el Instituto Nacional de Control y Estándares Biológicos (NIBSC), Inglaterra.

Para el control de calidad de los tres lotes de OPV recibidos se realizó el ensayo de potencia, identidad y termoestabilidad, según describe la OMS. En este ensayo la potencia de la vacuna oral contra la polio, o sea, del contenido total y de los serotipos individuales, es determinada a través de un ensayo de neutralización "in vitro" utilizando un sistema celular sensible para el crecimiento de los virus. La prueba de identidad se llevó a cabo para identificar los serotipos individuales incluidos en la vacuna, con las mezclas de anticuerpos monoclonales específicos. Para la prueba de termoestabilidad se incubaron las muestras de vacuna durante 48 horas a 37° C [6].

El cálculo del título viral se determinó mediante el método de Spearman-Kaerber y los resultados finales se expresaron como la dosis que infecta el 50 % de los pocillos inoculados (DICC<sub>50</sub>), por dosis humana de vacuna [6].

Como criterios de validez del ensayo se tuvieron en cuenta que las monocapas celulares fuesen confluentes y definidas al 7mo día en los controles celulares, que el efecto citopático (ECP) del virus fuera decreciente frente a diluciones crecientes de la vacuna, que las diluciones de vacuna

incluyeran el 0 y el 100% del ECP y que el título de la vacuna de referencia no variara más que  $0.5 \log_{10}$  DICC<sub>50</sub> con respecto al establecido.

Como límites de aprobación del ensayo de potencia se tuvo en cuenta que las potencias calculadas para cada muestra fueran mayores o iguales a la potencia por dosis (DICC<sub>50</sub>) recomendada para las vacunas utilizadas en el PAI (Polio I  $\geq 10^{6.0}$  DICC<sub>50</sub>/dosis, Polio II  $\geq 10^{5.0}$  DICC<sub>50</sub>/dosis y Polio III  $\geq 10^{5.8}$  DICC<sub>50</sub>/dosis). En el caso del ensayo de termoestabilidad, se adoptó como criterio que el título de la vacuna incubada a 37°C por 48 horas, no podía perder más de  $0.5 \log_{10}$  DICC<sub>50</sub> en relación con el título de la vacuna conservada en condiciones adecuadas de temperatura [6].

### Resultados y Discusión

En todos los casos se cumplieron los criterios de validez del ensayo, ya que se obtuvieron monocapas confluentes de células Vero y no se detectó pérdida de la arquitectura celular. El ECP viral observado fue menor en la medida que fue mayor la dilución de la vacuna. En la menor dilución se presentó ECP en todos los pocillos y de forma inversa en la dilución más alta.

En el caso del MR de trabajo se muestran, en la Tabla 2, los valores de los títulos obtenidos durante los 5 ensayos realizados. En las 5 determinaciones, el título de la vacuna de referencia, no varió más que  $0.5 \log_{10}$  DICC<sub>50</sub>. Los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos para el material de referencia que son para el componente polio 1 (6.19-6.79), polio 2 (5.41-5.82) y polio 3 (5.94-6.28) y en el caso de la vacuna total (6.60-7.19) y en termoestabilidad (6.29-6.87).

En la Tabla 3, aparecen los resultados obtenidos en el ensayo de potencia e identidad para los tres lotes evaluados:

En todos los casos los títulos obtenidos para cada componente individual de la vacuna están por encima del título recomendado como especificación por la OMS para este producto (Polio I  $\geq 10^{6.0}$  DICC<sub>50</sub>/dosis, Polio II  $\geq 10^{5.0}$  DICC<sub>50</sub>/dosis y Polio III  $\geq 10^{5.8}$  DICC<sub>50</sub>/dosis). La diferencia entre los resultados correspondientes al mismo lote de vacuna para cada caso analizado se encontraba dentro del intervalo de  $0.5 \log$  y el [6,7].

En la Tabla 4, se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de termoestabilidad y las diferencias entre ambas vacunas a ensayar.

Como puede apreciarse en todos los casos las diferencias calculadas son menores de  $0.5 \log$ , lo que está acorde con el límite de aprobación del ensayo de termoestabilidad para esta vacuna [6].

En la Tabla 5, se muestran los valores obtenidos de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para los tres lotes evaluados.

Para los tres lotes el coeficiente de variación fue menor del 20%, que es la variabilidad mínima recomendada para este tipo de ensayos biológicos [8].

En la Fig. 1, aparecen los resultados obtenidos al comparar los títulos calculados en el laboratorio con los obtenidos por el fabricante del producto para el ensayo de potencia e identidad.

Como puede observarse, en el caso de los componentes Polio 1 y Polio 2, los títulos obtenidos en el laboratorio son inferiores a los que reporta el fabricante, pero en un rango no mayor de  $0.5 \log$ . En el caso específico del componente Polio 3 la pérdida es mayor, aunque no se afecta el criterio de aceptación del ensayo [6].

En los casos analizados, a pesar de la pérdida del título viral de Polio 3 con respecto al valor que se reporta por el fabricante se obtuvieron títulos mayores que  $10^{5.8}$  DICC<sub>50</sub>, lo que cumple con el límite de aceptación del ensayo y por esta razón se consideró el resultado como válido para la liberación de los lotes.

En la Fig. 2, se muestra la comparación de los títulos obtenidos por el laboratorio y el fabricante para la vacuna total y la ensayada en condiciones de termoestabilidad

En el caso del ensayo de termoestabilidad, se obtuvieron las mayores diferencias con respecto a los valores reportados por el fabricante. La disminución del título total de la vacuna se debe a las pérdidas de los títulos para cada componente, incluso como para el componente Polio 3 se reportaron pérdidas mayores de 0.5 log, es de esperarse que para la vacuna total exista una disminución más pronunciada del título [9,10].

A pesar de las diferencias obtenidas en los títulos con respecto al fabricante, como para ambas vacunas sometidas a ensayo (en condiciones normales y en termoestabilidad), se cumplen los límites de aceptación de la prueba se consideraron los resultados válidos para la liberación de los lotes.

En la Tabla 6, se reportan los resultados en porcentajes de la pérdida de infectividad de la vacuna.

Entre las vacunas que se incluyen en el PAI la OPV es considerada la menos estable. De todos los componentes el más afectado fue el polio 3, que se ha reportado en la literatura como el más lábil [9,10]. Además, teniendo en cuenta que se han producido afectaciones durante el traslado y conservación de la vacuna una vez que se recibe en el país es de esperar que se presente la pérdida de infectividad

detectada y sobre todo que los porcentajes sean mayores para el serotipo 3 [11].

Los resultados obtenidos han permitido, que por primera vez en Cuba se liberen lotes de OPV a partir de los ensayos biológicos de potencia, identidad y estabilidad, tal como lo recomienda la OMS [7]. En cada certificado de liberación de lote de OPV se incluyó, además de las conclusiones de la revisión de la documentación y su comparación con los requerimientos internacionales, los valores de potencia, identidad y termoestabilidad obtenidos en el laboratorio.

El criterio emitido por el laboratorio constituye una poderosa herramienta que complementa el proceso de liberación de lotes que se lleva a cabo en el CECMED como centro encargado de velar por la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos.

### Referencias bibliográficas

- [122] Microbiología y Parasitología Médicas. Picornavirus. Ed Ciencias Médicas. Tomo II 2001, Capítulo 64: 188-201
- [123] Mensi C, Preliasgo F. Poliomyelitis: present epidemiological situation and vaccination problems. Clin Diagn Lab Immuno 1998; 5:278 - 280.
- [124] Más P. Erradication of poliomyelitis in Cuba: a historical perspective. Bull WHO, 1999; 77: 681-687.
- [125] Más P. Erradication of poliomyelitis in Cuba: mass campaign administration of trivalent oral poliovirus vaccine and seroprevalence of poliovirus neutralizing antibodies. Bulletin of the World Health Organization 1994; 72(2): 221-25
- [126] Guidelines for national authorities on quality assurance for biological products. In WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-second Report. Geneva. WHO, 1992, Annex 2 (WHO Technical Report Series).
- [127] Manual of Laboratory Methods for Potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on immunization, WHO/BLG/95.1
- [128] Milstien JB, Zaffran M, Wood DJ, Griffiths E. Laboratory test for live attenuated poliovirus vaccine. Biologicals. 1999; 26(3): 245-246.

- [129] Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Validación. WHO/VSO/97.02
- [130] Pipkin PA and Minor PD. Studies in the loss of infectivity of live type 3 poliovaccine on storage. *Biologicals*. 1998; 26:17-23.
- [131] Rombaut B, Verdehydén B, Andires K, Boeyé A. Thermal inactivation of oral poliovirus vaccine: contribution of RNA and protein inactivation. *J.Virol*. 1994; 68: 6454-57.
- [132] Adu FD, Adedeji AA, Esan JS, Odusanya OG. Live viral vaccine potency: an index for assessing the cold chain system. *Public Health*, 1996; 73 (9): 579-82.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Especificaciones de los lotes de vacuna antipoliomielítica oral de la firma Aventis Pasteur.**

	Título Polio I	Título Polio II	Título Polio III	Título Polio Total	Título Polio Termoestabilidad
Lote 1 W5638	6.74	5.72	6.83	7.10	6.88
Lote 2 W5830	6.49	5.50	6.70	6.85	6.58
Lote 3 U 6474	6.74	5.72	6.83	6.88	6.44

Los títulos son expresados en  $\log_{10}$  DICC<sub>50</sub>.

**Tabla 2. Títulos de la Vacuna de Referencia lote U6408.**

Ensayo	Título Polio 1	Título Polio 2	Título Polio 3	Título Polio Total	Título Polio Termoestabilidad
1	6.55	5.57	6.17	6.75	6.51
2	6.42	5.61	6.05	6.75	6.43
3	6.26	5.44	6.05	6.76	6.43
4	6.49	5.76	5.99	6.82	6.55
5	6.31	5.49	5.96	6.68	6.37

Los títulos son expresados en  $\log_{10}$  DICC<sub>50</sub>.

**Tabla 3. Títulos de los lotes 1, 2 y 3 en los ensayo de potencia e identidad.**

Ensayo	Componente Polio 1			Componente Polio 2			Componente Polio 3		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
1	6.43	6.43	6.38	5.49	5.38	5.31	6.05	5.82	6.09
2	6.36	6.44	6.48	5.43	5.36	5.51	6.07	5.92	6.11
3	6.28	6.32	6.31	5.43	5.31	5.37	5.91	5.8	5.92
4	6.4	6.24	6.53	5.37	5.38	5.56	5.91	5.85	6.16
5	6.53	6.12	6.3	5.43	5.25	5.25	5.87	5.8	5.99

Los títulos son expresados en  $\log_{10}$  DICC<sub>50</sub>.

**Tabla 4. Títulos y diferencias logarítmicas de los lotes 1, 2 y 3 en el ensayo de termoestabilidad.**

Ensayo	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	PTotal	PTe	Dif	PTotal	PTe	Dif	PTotal	PTe	Dif
1	6,71	6,31	0,4	6,61	6,31	0,3	6,55	6,19	0,36
2	6,78	6,42	0,36	6,73	6,37	0,36	6,61	6,31	0,3
3	6,71	6,43	0,28	6,57	6,32	0,25	6,38	6,05	0,33
4	6,75	6,37	0,38	6,68	6,43	0,25	6,66	6,25	0,41
5	6,68	6,38	0,3	6,67	6,25	0,42	6,49	6,11	0,38

Los títulos son expresados en  $\log_{10}$  DICC<sub>50</sub>.

**Tabla 5. Valores de media, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) de los lotes 1, 2 y 3.**

Componente	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	Media	DS	CV	Media	DS	CV	Media	DS	CV
Polio 1	6.40	0.09	1.44	6.31	0.13	2.13	6.40	0.10	1.60
Polio 2	5.43	0.04	0.78	5.34	0.05	1.05	5.40	0.13	2.43
Polio 3	5.96	0.09	1.53	5.84	0.05	0.86	6.05	0.10	1.60
Polio Total	6.73	0.04	0.58	6.65	0.06	0.94	6.54	0.11	1.67
Polio estabilidad	6.38	0.05	0.75	6.34	0.07	1.07	6.18	0.10	1.69

**Tabla 6. Porcentaje de pérdida de infectividad de los lotes 1, 2 y 3 de OPV referida a los valores que reporta el fabricante.**

Componente	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Polio 1	5.04	2.77	5.04
Polio 2	5.07	2.90	5.59
Polio 3	12.7	12.84	11.42
Polio Total	5.21	2.92	4.94
Polio termoestabilidad	7.27	3.65	4.03

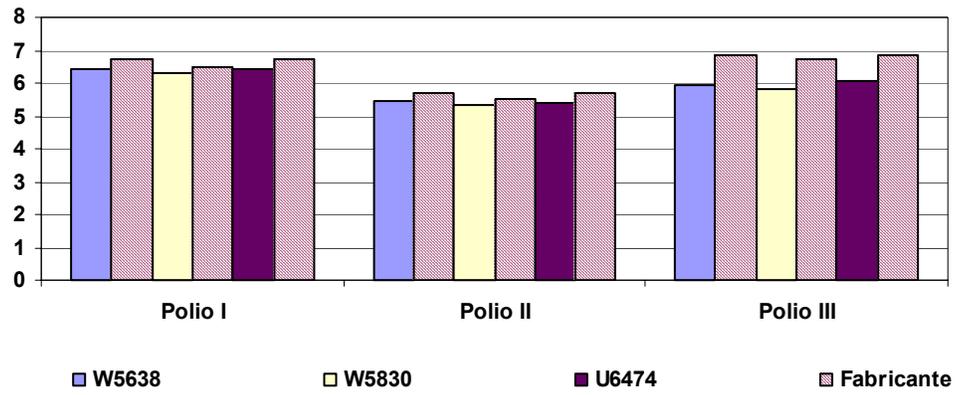


Fig. 1. Comparación de títulos obtenidos por el fabricante y el LCC-I para los lotes 1,2 y 3 en Ensayos de potencia e identidad.

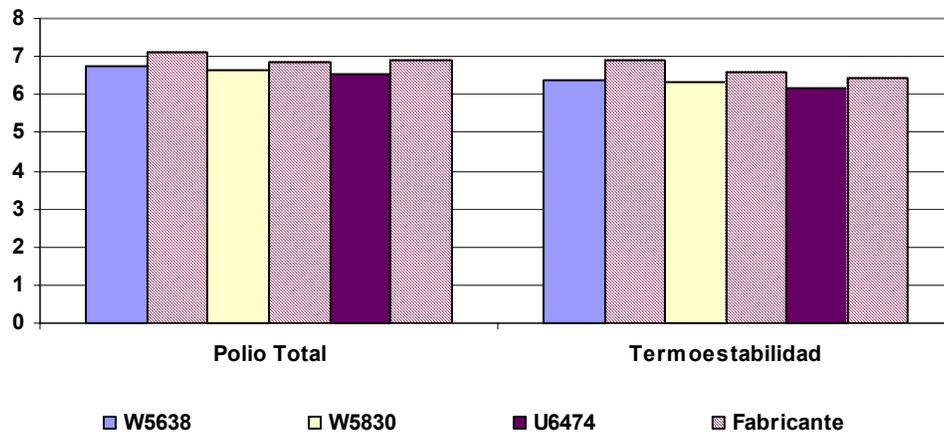


Fig. 2. Comparación de títulos obtenidos por el fabricante y el LCC-I para los lotes 1,2 y 3 en Ensayos de termoestabilidad.

***EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE FILTRACIÓN POR MEMBRANAS Y PLACA VERTIDA EN EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS PURIFICADAS EN EL LABORATORIO NACIONAL DE CONTROL DE LA CALIDAD***

Lic. Adamelis Rosario Avilés Boza, Lic. Raisi Morales Valdés, Lic Maria de los Angeles Ramos García.

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), E-mail: rosy@cecmmed.sld.cu

### **Resumen**

El agua purificada en la Industria Farmacéutica es utilizada en la limpieza de las instalaciones, equipos, lavado de cristalería y otros materiales, preparación de soluciones y medios de cultivos, así como en la formulación final de los medicamentos estériles y no estériles. Ésta debe reunir una serie de requisitos a fin de que su carga microbiana sea mantenida.

El sistema de obtención de agua purificada en el CECMED se monitoreó para determinar el nivel de contaminación desde el punto de vista microbiológico en cada punto de muestreo (destilador y botellón de almacenamiento) del agua utilizando los métodos de placa vertida y filtración por membrana.

Ambos métodos fueron comprobados en nuestras condiciones con el propósito de evaluar cuál resulta más factible para la determinación de la contaminación del agua purificada utilizada en el Laboratorio.

Como resultado se obtuvo que el método más factible fue el de placa vertida, cuyos resultados nos permitieron concluir que se puede emplear el agua destilada obtenida en nuestras condiciones siempre que se garantice la efectividad del proceso de esterilización de los medios de cultivos empleados para nuestro trabajo en el laboratorio.

**Palabras claves:** Agua, Control Microbiológico, Laboratorio, Métodos

### **Introducción**

El agua que se emplea en los procesos de producción, control de calidad, así como en la formulación de los medicamentos debe reunir una serie de características a fin de que su calidad sea mantenida. Para ello, se emplean diferentes calidades de agua como son: Agua potable, Agua purificada y Agua para inyección.

El agua potable es aquella para beber suministrada a la ciudad y, que generalmente, ha sufrido algún tratamiento previo como puede ser filtración, suavizamiento o algún tratamiento químico para separar las sustancias tóxicas o los compuestos dañinos [1]. De igual forma, para la obtención de agua de alta pureza, se requiere de un agua de entrada que cumpla con los requerimientos de la A.P.M.A (Agencia de Protección del Medio Ambiente). En tanto, el agua purificada es específicamente la obtenida por destilación, intercambio iónico, ósmosis inversa u otro proceso adecuado, y el agua para inyección es el agua obtenida por ósmosis inversa y destilación, que no contiene ninguna sustancia adicionada. El agua estéril para inyección es la que se emplea para reconstituir parenterales.

Las aguas purificadas, en general, se utilizan para la fabricación de formas farmacéuticas no inyectables y para el lavado y enjuague de los equipos y recipientes que están en contacto con el producto, así como en la preparación de medios de cultivos, reactivos y soluciones, además de que se utiliza en la preparación de soluciones sujetas a esterilización final [2].

El agua purificada utilizada en la elaboración de medicamentos estériles y no estériles, así como en la preparación de medios de cultivos, reactivos y soluciones debe reunir una serie de características

físico-químicas y microbiológicas [3-4]. En la Tabla 1, se relacionan las especificaciones físico-químicas y microbiológicas de las aguas purificadas y para inyección [5].

Los métodos generales descritos en la literatura [6-7], son considerados apropiados para el establecimiento del número de Unidades Formadoras de colonias (UFC) observadas durante el monitoreo microbiológico del agua. Sin embargo, es reconocido que otras combinaciones de medio, tiempo y temperatura de incubación pueden ocasionalmente, resultar en número mayores de UFC.

Los períodos de incubación prolongados que son usualmente requeridos en algunos métodos alternativos disponibles, presentan como desventajas, que pueden sobrestimar los conteos de UFC obtenidas. Luego, el agua purificada debe ser evaluada para la verificación de su calidad microbiológica. Tal verificación puede realizarse a través de diversos métodos de ensayo [8-9]. Es recomendable la utilización de métodos fáciles de cumplimentar, poco costosos y que permitan un excelente procesamiento de muestra como: Tubos múltiples o NMP, Método por placa vertida, Filtración por membrana.

La toma de muestra es el primer paso a realizar para el análisis. Es fundamental una correcta toma de la misma, ya que aún disponiendo de recursos y técnicas más sensibles, si no se realiza una correcta toma de muestra, se llegarán a resultados no reales. Deben tenerse en cuenta los puntos a muestrear en el sistema que deben ser establecidos durante la validación [10]. La muestra debe ser tomada en un frasco estéril y en condiciones lo más asépticas posible, se

debe dejar drenar de 3 a 5 minutos antes de tomar la muestra.

El volumen de la muestra a tomar debe ser representativo, se recomienda un tamaño de muestra no menor de 150 mL, en caso de realizar la técnica de filtración por membrana, el volumen debe ser de 500 mL.

Una vez tomada la muestra, se debe procesar lo antes posible. Si es necesario, su conservación no debe exceder las 4 horas a una temperatura de  $2-10^{\circ}\text{C}$  [4].

El Método de tubos múltiples para el análisis de agua potable o agua de entrada, se recomienda para el análisis de aguas potables [3-4]. El mismo consiste en la determinación de la posible presencia de microorganismos coliformes en la fuente de abasto, ya que su presencia puede ser indicador de la existencia de patógenos.

Dicho método consta de dos fases, una presuntiva y confirmativa. En la primera, son inoculados una serie de tubos que pueden ser 5 o 10 (si se quiere obtener mayor exactitud del estimado de coliformes en la muestra, debe usarse una serie de 10 tubos), conteniendo 10 mL de la muestra. Se incuba a  $34-35^{\circ}\text{C}$  de 24-48 horas. Los tubos que presenten acumulación de gas en la campana durante este período pasarán a la fase confirmativa. En ésta se toma una asada de cada tubo con producción de gas y se inocula en un tubo conteniendo 10 mL de caldo Verde Brillante. Se incuba a  $34-35^{\circ}\text{C}$  de 24-48 horas. Se observa si hay producción de gas en algún tubo por desplazamiento de líquido en la campana Durhams. Según el número de tubos que presenten crecimiento con producción de gas, se busca el resultado en la Tabla 2 de probabilidades.

De igual forma, existen otros 2 métodos muy utilizados para realizar el control microbiológico del agua. Ellos son el

Método de placa vertida y el de Filtración por membrana. El primero de ellos se usa para determinar la concentración de microorganismos viables aerobios mesófilos en muestras de agua potable o agua purificada. Se utiliza cuando el producto presenta buena solubilidad y transparencia que no interfiera en la lectura de las colonias de microorganismo por placa. Este método tiene la desventaja de que el tamaño de la muestra a inocular es muy pequeño, por lo que la sensibilidad es relativamente baja.

Por su parte, el segundo se emplea para determinar el conteo total de aerobios, microorganismos coliformes y presencia en dependencia de medio de cultivo [4] y consiste en hacer pasar una alícuota de la muestra a través de una membrana, en condiciones asépticas y colocar la membrana sobre la superficie de un medio adecuado y contar las UFC presentes en el volumen de muestra filtrada.

En nuestro Centro, el proceso de obtención de agua se realiza, según se explica en la literatura [6-7], la misma es almacenada en botellón de poliestireno de 20 Litros, proveniente de la firma Polylabo, los cuales poseen calidad térmica y microbiológica suficiente como para asegurar el almacenamiento del agua purificada durante periodos de tiempo no muy prolongados. Para la higienización del botellón de almacenamiento de agua de nuestro laboratorio, el mismo es fregado con abundante agua y detergente industrial y desinfectado con una solución de alcohol al 70%; esta higienización se realiza cada vez que se va a adquirir el agua destilada y es registrada según se establece en el REG.-I.: 05.029.01 " Registro de fregado del botellón".

La calidad del agua destilada depende en gran medida de las características fisico-químicas y microbiológicas, porque en

nuestro trabajo, si bien las cualidades fisico-químicas (pH, sustancias oxidables) son importantes, porque el ajuste de pH del medio de cultivo es imprescindible para un buen desarrollo bacteriano, el mantenimiento de la calidad y especificaciones microbiológicas resulta mucho más difícil, ya que la misma está determinada por la presencia de microorganismos que pueden afectarla, ya sea con sustancias tóxicas que inhiban el desarrollo de los microorganismos, o de sustancias que los puedan estimular [11-12]. Entre los microorganismos que afectan la calidad del agua podemos encontrar: Bacterias pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Proteus*. También es posible encontrar *Xantomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Enterobacter* y *citrobacter*. Además, se ha reportado la presencia del Género *Pseudomonas* [13-14].

El control microbiológico del agua en el CECMED reviste una gran importancia ya que es uno de los parámetros que garantizan la calidad de los medios de cultivo preparados en el Laboratorio y utilizados en los ensayos microbiológicos de control de calidad que la Autoridad Reguladora de Medicamentos ejecuta como servicio para una de las más importantes funciones del CECMED, como la vigilancia post comercialización.

## **Materiales y Métodos**

### ***Materiales***

Para este estudio se empleó agua purificada almacenada y obtenida en nuestras condiciones.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivos:

#### ***Agar Triptona Soya***

Medio de propósito general para el cultivo de una amplia variedad de

microorganismos. Preparado según la descripción del fabricante. (Catálogo de Medios de Cultivos. Biocen, 2004-2005)

#### *Agar para conteo en placa*

Este medio se emplea para la enumeración de bacterias en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos. (Conteo microbiológico de productos alimenticios y agua residuales) Preparado según la descripción del fabricante. (Catálogo de Medios de Cultivos. Biocen, 2004-2005).

#### *Agar MacConkey*

Medio diferencial para la obtención, aislamiento y enumeración de bacterias coliformes y patógenos intestinales en aguas, productos lácteos y muestras biológicas. Preparado según las instrucciones del fabricante. (Catálogo de Medios de Cultivos. Biocen, 2004-2005).

#### *Agar Salmonella y Shigella*

Medio selectivo para aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Preparado según las instrucciones del fabricante. (Catálogo de Medios de Cultivos. Biocen, 2004-2005).

#### *Base Agar Cetrimide*

Medio para aislamiento y cultivo de *Pseudomonas*. Preparado según las instrucciones del fabricante. Difco.

### ***Métodos***

#### *Tinción Bacteriológica*

Se realizó según se describe en la instructiva I.: 05.001 "Tinción de Gram". Tinción para diferenciar las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.

#### *Pruebas bioquímicas*

Con el objetivo de identificar al microorganismo aislado se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas[11,12,13]:

- Prueba de la catalasa.
- Citocromo oxidasa.
- Voges Proskauer y Rojo de Metilo.
- Hung leifson O/F.
- Citrato de simons.
- Gelatina.
- Descarboxilación de la Lisina, Ornitina y Arginina.
- Agar urea.
- Indol.
- Motilidad.
- Agar tres azucres Hierro.

#### *Procedimiento para la toma de muestra*

La toma de muestra se realizó en dos puntos de muestreo:

- Salida de agua del destilador.
- Botellón de almacenamiento de agua destilada.

En cada punto de muestreo la muestra se tomó en frascos de vidrio estériles y en condiciones lo más asépticas posible. Se dejó correr el agua entre 3-5 minutos y se recogió 120 mL en frasco de 250 mL para el método de placa vertida y 500 mL en frasco de 1000 mL para filtración por membrana. Al tomar la muestra, no se debe tocar con las manos la boca del frasco, ya que se introducen errores en los resultados.

#### *Métodos para el control microbiológico del agua*

Las muestras fueron analizadas para cada punto de muestreo por los métodos de placa vertida y filtración por membrana para determinar el conteo total de viables y de aislamiento de microorganismos patógenos.

Conteo total de microorganismos viables aerobios por el método de placa vertida

La muestra para el frasco que contenía 120 mL fue homogeneizada por agitación. Con una pipeta estéril se tomó 1 mL de cada frasco a analizar y se depositó en 4 placas petri estériles. Se añadió aproximadamente de 15-20 mL de medio Agar para conteo (APC) y medio Agar Cetrimide, fundido a 45 °C, en cada placa, se rotaron las mismas en ambos sentidos y se dejaron solidificar. Se invirtieron y se incubaron de 30-35°C por 48 h las placas de APC y de Agar Cetrimide. Posteriormente se contaron las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) en cada placa y se calculó el valor medio y se multiplicó por el factor de dilución expresándose los resultados en UFC/mL.

Conteo total de microorganismos aerobios por el Método de filtración por membrana

El equipo de filtración lavado y enjuagado con abundante agua destilada esterilizado a 121°C por 20 minutos.

El proceso se realizó de la siguiente forma: Una vez que la muestra de 500 mL fue agitada, se añadieron 100 mL en el embudo del equipo de filtración y se filtró al vacío. Una vez terminada la filtración se tomaron las membranas de 0.45 µm con pinzas estériles y se depositaron en la superficie de las placas con medio APC y medio Agar Cetrimide. Se invirtieron y se incubaron a 30-35 °C por 24 h las placas de APC y Agar Cetrimide. Se contaron las UFC presentes en la membrana y se expresaron los resultados en UFC/mL.

Determinación de microorganismos

Para la preparación de estos medios de cultivos, se siguieron las instrucciones del fabricante (Catálogo de Medios de Cultivos. Biocen, 2004-2005). Una vez esterilizados y enfriados a 45<sup>0</sup> C, se

distribuyeron en placas petri estériles y se dejaron solidificar.

- Agar Triptona Soya.
- Agar MacConkey.
- Agar Cetrimide.
- Agar ss.

Las colonias obtenidas en el método por placa vertida y filtración por membrana se aislaron a medio de aislamiento Agar Triptona Soya por estría. Las placas fueron incubadas de 30-35<sup>0</sup> C por 48 h. Transcurrido este tiempo, se tomó una asada de las colonias obtenidas en el conteo y se sembró en medios diferenciales por estría (Agar MacConkey, Agar ss y Agar Cetrimide) por duplicado. Se invirtieron y se incubaron a 30-35 °C por 24 h.

**Resultados y Discusión**

En las Tablas 3 y 4, se muestran los resultados del conteo de viables por el método de placa vertida en los dos puntos de muestreo.

En la misma, se puede apreciar que la toma de muestra para el caso del punto de salida del agua se tomó en tres frascos estériles, los frascos fueron enumerados según se fue almacenando el agua y así se analizaron; el frasco 1 se analizó el primer día; el frasco 2 el segundo día y el tercer frasco el tercer día con vistas a comprobar el nivel de contaminación. Resulta apreciable que los frascos del primero, segundo y tercer día, mostraban una baja carga microbiana, lo cual pensamos pudiera deberse a que cuando el agua es obtenida del destilador sale con una temperatura que impide que los microorganismos proliferen.

Para el caso del Botellón, se observa que la carga microbiana aumenta considerablemente fuera de los límites, si

se tiene en cuenta que para el agua purificada se considera generalmente como límite: No más de 100UFC/mL y ausencia de patógenos. La Fig. 1, muestra el comportamiento de los niveles de UFC en función del tiempo de almacenamiento en el botellón.

Como puede observarse, existe un incremento de las UFC a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento en el botellón. A pesar de la higienización y de las condiciones, no idóneas para la proliferación, del local donde se conserva el botellón, este resultado no es sorprendente tomando en cuenta que esta materia viva tiene la habilidad de adaptarse y reproducirse, además de que son capaces de formar parte de la biopelícula acuática, son generalmente mucho más activas metabólicamente que las bacterias de vida libre. Ellas poseen alta afinidad por los sustratos. Esto puede deberse a la baja energía de activación que requieren para unirse al sustrato y el mejoramiento de la geometría de los sitios de unión de toma del sustrato.

Estas bacterias también poseen una baja reorganización de los componentes celulares. Existen mecanismos de supervivencia en ambientes poco nutritivos como es caso de la Quimiotaxis, hay microorganismos que no son móviles en ambientes poco nutritivos como es el caso de la Quimiotaxis a sustratos tales como aminoácidos y han mostrado luego una actividad normal cuando se incrementa la concentración de nutrientes [15-16]. Este aspecto facilita el movimiento de las células en función del gradiente de concentración que se crea por la fijación de la materia orgánica sobre las superficies, la presencia de estructuras como flagelos, fimbrias, en estas bacterias tiene gran importancia en la adherencia en estos ambientes bajos en nutrientes.

Por razones experimentales, no fue posible analizar las muestras tomadas directamente del destilador para el método de filtración por membrana. En este caso específico dicho método se aplicó solamente a las muestras tomadas del botellón de almacenamiento y las UFC resultaron ser incontables. Este resultado se debe a que este método permite determinar muestras de agua con un bajo índice de contaminación siendo más sensible que otros métodos. Además, como ventajas adicionales la filtración por membrana permite evaluar grandes volúmenes de agua (100 mL) por lo que la cantidad de muestra es más significativa, sus resultados se obtienen en 24h y se requiere un bajo volumen de medio de cultivo. Sin embargo, el alto costo de las membranas y el equipo de filtración, entre otras desventajas limita su utilización.

#### **Identificación de los microorganismos aislados:**

En la Tabla 5, se presentan los resultados de los microorganismos aislados.

Derivado del análisis de la tabla anterior, puede asegurarse que los coliformes presentes en las muestras ensayadas no correspondieron a las especies *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* dado que no existe crecimiento en (Agar Cetrimide, Agar SSy Agar Macconkey). En tanto, sí se obtuvo crecimiento en medio Macconkey, observándose colonias amarillo a las que se le realizó tinción de Gram, observándose al microscopio Bacilos Gram (-), y pruebas bioquímica como se observa en la Tabla 5, por lo que podemos concluir que pertenecen al género *Enterobacter* (especie *Enterobacter agglomerans*); estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en aguas frescas, suelo, plantas y

vegetales, según [13]. Debe señalarse que *E. coli* sí crece en medio Macconkey, pero morfológicamente sus colonias se caracterizan por ser grandes, rosadas o rojas con precipitado opaco, lo cual no detecta la presencia en el agua ensayada dado los resultados experimentales obtenidos.

Las monografías individuales para agua purificada y agua para inyección no incluye límite microbiano específico. Estos fueron omitidos, dado que la mayoría de las técnicas microbiológicas más disponibles requieren al menos de 48 h para obtener resultados definitivos, tiempo para el cual dicha agua, ya fue utilizada en el proceso de producción. Resulta oportuno consignar que este aspecto no posee un particular impacto en nuestros ensayos, ya que en nuestro laboratorio se esterilizan los medios de cultivos que son empleados específicamente en el ensayo de límite microbiano. De estos medios de cultivos preparados se toman muestras representativas del lote para comprobar su esterilidad y ensayo de promoción de crecimiento a fin de detectar cualquier contaminación que pueda estar presente y afectar la confiabilidad de nuestros resultados.

Este resultado nos demuestra que se debe tomar una mayor precaución durante el manejo y almacenamiento del agua haciendo énfasis en la higienización del botellón de almacenamiento, asegurando que esta mantenga la misma calidad que cuando se obtiene del destilador.

Como resultado de este trabajo se obtuvo que, existió un mayor grado de contaminación en el botellón de almacenamiento del agua purificada, lo que implica que se debe tener un mayor cuidado en la higienización del mismo, y se demostró que el método de análisis

microbiológico más adecuado a nuestras condiciones de trabajo es el método de placa vertida. De igual forma se corroboró que se puede emplear en nuestros ensayos el agua destilada obtenida en nuestras condiciones siempre que se garantice la efectividad del proceso de esterilización de los medios de cultivo.

### Referencias Bibliográficas

- [133] Pharmacopeia National Formulary USP 23, P. 1635-1637, 1684, 1984. Rockville, MD. 1995.
- [134] Roscioli N., Scoot A. and Michael B. I. Regulatory Practice for Biopharmaceutical Production. Adited by Anthony S. Llubiniechi and Lusan A. Vargo, P. 338-405 1994.
- [135] Collentro W. Pharmaceutical water, an overview of usp purified water-Part I.
- [136] Ultrapure water Nov 1992.
- [137] American Public Healt Association (A.P.H.A.), American water woks Association & Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Clescery, A. Greenberg, R. Trusell (ed.). P9010-10000. 17<sup>th</sup> ed. Washington, D. C.1989.
- [138] Horwood, E. Guide To Microbiological Control in Pharmaceutical. A. Division of Simon and Schuster Internatinal Group, England 1990.
- [139] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7<sup>a</sup> ed. Tomo I. P.489. 20000.
- [140] Lennette E. y Balows A. Manual de Microbiología Clínica. P. 1215-1216, 1227-1228. 3<sup>ra</sup> Edición, Edición Revolucionaria. 1982.
- [141] Manual ADSA. Ref. 6-006. 1989.
- [142] Thomas. A. J., et. Al., Detection of L-forms of *pseudomonas aeruginosa* during microbiological Validation of Filtres. Pharm. Technol. 15(10) p. 74-80, 1991.
- [143] British Pharmacopoeia. Vol. II. United Kinddom for HMSO, London. P. 706-707, 1993.
- [144] Pharmacopeia National Formulary USP XXII, p. 1457. Rockville, MD. 1990
- [145] Bergey's Manual of determinative Bacteriology 9a ed., 1994
- [146] Payne D. N. Microbial Ecology of the pruction Process. Guide to Microbiological control in Pharmaceuticals. Pag 53-67, Editors S.P. Denyer Department of Pharmaceutical 1990.

154 Trabajo experimental

[147] Manual de prácticas de Laboratorio de Bacteriología. Pazos, V.; Coto, O. 1986.

[148] Barrow G.I. and Feltham, Cowan and Steel's Manual for identification of medical bacteria, third edition edite and Revised Cambridge University Press, 1993.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Especificaciones físico-químicas y microbiológicas de las diferentes aguas según la USP XXII.**

Categoría	Agua purificada	Agua para inyección
PH	5.0-7.0	5.0-7.0
Cloruro (mg/L)	0.5	≤0.5
Sulfato (mg/L)	≤5.0	≤5.0
Amonio (mg/L)	≤0.3	≤0.3
Calcio (mg/L)	≤1.0	≤1.0
Dioxido de Carbono	Negativo	Negativo
Met. Pesados (mg/L)	0.4	0.4
Sust. Oxid. (mg/L)	3-4	3-4
Sol. Totales (mg/L)	≤1.0	≤1.0
Sust. Adc. (mg/mL)	Ninguna	Ninguna
Pureza Bacteriana	≤100UFC/mL	≤0UFC/100mL
Endotoxinas	No requerido	≤0.25UE/mL

**Tabla 2. Número más probable de microorganismos. Método de tubos múltiples.**

Combinación de números de tubos que muestran crecimiento en cada hilera Número de mg o mL de la muestra por tubo			Número más probable de microorganismos por g o mL
100 (100 µL)	10 (10 µL)	1 (1 µL)	
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

**Tabla 3. Resultados del conteo por el método de placa vertida. (Salida del agua).**

	Primer día (UFC/mL)	Segundo día (UFC/mL)	Tercer día (UFC/mL)	General (UFC/mL)
Conteo 1	10.0	12.0	11.0	
Conteo 2	7.0	13.0	10.0	
Suma	17.0	25.0	21.0	
Promedio	8.5	12.5	10.5	10.5

\* Punto de muestreo: Salida del agua (3 Frascos estériles); Medio de cultivo: Agar para Conteo en placa.

**Tabla 4. Resultados del conteo por el método de placa vertida. (Botellón de almacenamiento).**

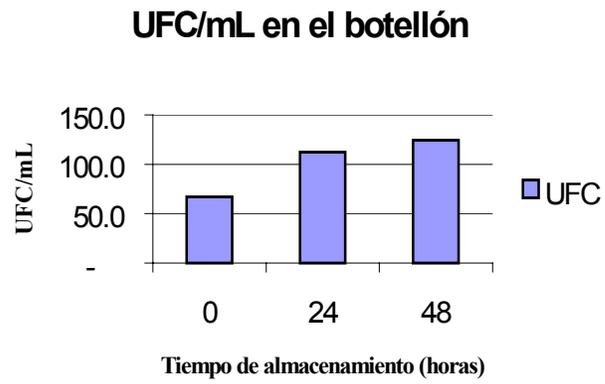
	Primer día (UFC/mL)	Segundo día (UFC/mL)	Tercer día (UFC/mL)	General (UFC/mL)
1	66.0	120.0	137.0	
2	68.0	105.0	112.0	
Suma	134.0	225.0	249.0	
Promedio	67.0	112.5	124.5	101.3

\* Punto de muestreo: Botellón de almacenamiento; Medio de cultivo: Agar para Conteo en placa.

**Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.**

Medio	m.o.	Crecimiento	Pruebas Bioquímicas											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Agar SS	Salm.-Shig.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar Cetrimide	Pseudomonas A.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar MacConkey	Enterobacter agglomerans	+	+	+	Fermenta Glucosa	+	+	Lis, Or, Arg. (-)	-	-	+	+	-	

Leyenda: 1:Citocromo Oxidasa; 2:Voges Proskauer y Rojo Metilo; 3:Hung leifson O/F; 4:Citrato de Simona; 5:Gelatina; 6:Dexcarboxilación de Lisiina, Ornitina y Arginina; 7:Agar urea; 8:Indol; 9:Motilidad; 10:Agar tres azucares Hierro; 11:Catalasa.



**Fig. 1.** Comportamiento de los niveles de UFC en función del tiempo en el botellón de almacenamiento.

## **DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE LIDOCAINA EN EL UNGÜENTO Q.L.**

Lic. Danay Angélica Díaz Sutherland, Lic. Maite Elisa Oviedo Gálvez, Tec. Ana Irma Rodríguez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

### **Resumen**

Las patologías anorectales son muy frecuentes y su tratamiento se basa fundamentalmente en aliviar los molestos síntomas de la enfermedad. El brote hemorroidal agudo, es una afección que se trata con terapia combinada. Entre los fármacos empleados, ocupan un papel primordial los anestésicos locales. El clorhidrato de lidocaina se incorporó en una nueva formulación semisólida para el tratamiento tópico de las hemorroides combinado con el efecto antiinflamatorio y cicatrizante de la Quitina. Para registrar un nuevo producto, un paso indispensable lo constituye el diseño y validación de los métodos de análisis propuestos para el control de la calidad. Por la importancia que tiene actualmente el proceso de validación, ningún método analítico podrá ser aplicado antes de cumplimentar las exigencias que en el ámbito mundial hoy en día se plantean.

**Palabras claves:** ungüento, validación, clorhidrato de lidocaina, quitina.

### **Introducción**

La Lidocaina fue el primer anestésico local ampliamente aceptado que no contenía la función éster de la Cocaína, la Procaína y la Tetracaina. Se encontró que la Lidocaina era más potente que la Procaína, hecho que junto a su rápido inicio de la acción y una toxicidad razonable, la hizo superior y más digna de confianza. Con la Lidocaina, la incidencia de reacciones alérgicas es baja, aunque se observan bastante a menudo con los anestésicos de tipo éster. Otra ventaja de la Lidocaina es su estabilidad en disolución acuosa, que permite la esterilización por calor y garantiza la actividad farmacológica después de un almacenamiento prolongado [1].

El C.L resulta extremadamente estable en estado sólido (Fig. 1). En solución sufre

muy poca hidrólisis del enlace amido a 2,6- dimetilnilina y ácido 1,2-dietilamino acético, incluso a pH extremo y altas temperaturas. No presenta degradación por oxidación. Absorbe cantidad insignificante de H<sub>2</sub>O a 25 °C y al 80% de humedad [2-4].

Sobre la base de los elementos expuestos con anterioridad y considerando el valor que posee una investigación encaminada a incrementar las opciones terapéuticas a disposición del paciente; pretendemos cumplimentar los siguientes objetivos:

- Desarrollar la técnica analítica de cuantificación para el C.L en el ungüento rectal QL.
- Validar el método para control de calidad.

### **Métodos**

En la bibliografía se reportan numerosas técnicas analíticas para la cuantificación de lidocaina o su sal (clorhidrato) en diferentes matrices. Tal es el caso del método propuesto por Zhong y col. en 1989 [5], se destacan los desarrollados por Kereichuk y col. 1990 [6], Satake y col. 1991 [7], Zhou y col. 1992 [8], Katakya y Palmer en 1996 [9]. El uso de técnicas cromatográficas supera al resto de los métodos y esto fue realizado por Zivanovic y col en 1996 [10].

Se seleccionó la técnica analítica reportada en la BP 2000 [11] para el análisis del gel de clorhidrato de Lidocaina (C.L.), la cual fue adaptada de la siguiente forma:

13. Pesar la cantidad de ungüento equivalente a 11 mg de principio activo y dispensar en 120 mL de cloroformo con ayuda de agitación.
14. Añadir 20 mL de agua, 5 mL de buffer acetato pH = 2,8 y 5 mL de indicador mixto.
15. Agitar vigorosamente y permitir la separación de fases.
16. Valorar con dioctil sulfosuccinato de sodio 0.005 M agitando intensamente hasta observar cambio de coloración de verde a gris rosáceo en la capa clorofórmica.

Previamente se calcula el consumo teórico de valorante y se valora un blanco.

El contenido de C.L. se determina a través de la siguiente expresión:

$$\% = (M-B) \cdot f \cdot mEq \cdot 100 / A$$

donde:

M = mL de valorante consumidos por la muestra.

B = mL de valorante consumidos por el blanco.

F = factor de corrección del valorante.

mEq = mg de C.L. que reaccionan por cada mL de valorante 0.005 M.

A = masa de C.L. analizada en mg.

#### ***Preparación del valorante***

Disolver 2,25g de Dioctil sulfosuccinato de sodio en aproximadamente 800 mL de agua caliente con ayuda de agitación.

Dejar enfriar.

Trasvasar a un matraz volumétrico de 1000 mL y completar a volumen con agua.

Posteriormente, se calcula el factor de corrección del valorante a través del procedimiento descrito en la BP 2000 [11].

#### ***Factorización***

Se mezclan 25 mL de valorante con 25 mL de la solución A, 50 mL de cloroformo y 1,5 mL de bromofenol azul.

Valorar con yoduro de tetrabutilamonio 0.005M hasta observar aparición de color azul en la capa clorofórmica.

Solución A: Contiene 20% m/v de sulfato de sodio anhidro y 2% m/v de carbonato de sodio.

Posteriormente se calcula f:

$$f = \text{Masa valorada} / (\text{V consumido} \cdot \text{MEq})$$

#### ***Preparación del buffer acetato pH = 2,8:***

Disolver 1 g de acetato de sodio en 210 mL de agua.

Añadir suficiente ácido acético glacial hasta ajustar el pH a 2,8 (aproximadamente 38,75 mL).

Diluir con agua hasta 250 mL.

#### ***Preparación del indicador mixto.***

Se disuelven 10 mg de amarillo de metilo y 10 mg de azul de oracet B en 300 mL de Diclorometano.

#### ***Ensayos realizados***

Se aplicó el método anterior al análisis de las siguientes matrices:

e) Blanco.

f) Patrón de clorhidrato de Lidocaína al 100%.

g) Placebo + Quitina 100%.

h) Placebo + Quitina 100%+ C.L. 100%.

Cada ensayo se realizó por triplicado, utilizando los resultados obtenidos para el cálculo del % de principio activo, según la expresión de % reflejada.

#### ***Descripción de las modificaciones aplicadas.***

A continuación se relacionan las modificaciones introducidas a la técnica descrita

17. Se redujo el volumen de cloroformo empleado para disolver el ungüento a 30 mL.

18. Se disminuyó la cantidad de agua a 5 mL y de buffer a 1,5 mL
19. Se sustituyó el indicador mixto por 1 mL de amarillo de metilo.

***Preparación del indicador amarillo de metilo:***

Diluir en etanol 96° para obtener una solución 0.1mg/mL.

Con este nuevo método se llevaron a cabo los mismos ensayos descritos anteriormente.

*Validación del método para control de calidad.*

El método fue validado según los parámetros mínimos exigidos para la categoría I que incluye las técnicas destinadas a cuantificar principios activos en las formas terminadas que son:

1. Especificidad:  
Para control de la calidad.  
Para estabilidad.
2. Linealidad del sistema.
3. Linealidad del método.
4. Exactitud.
5. Precisión.
6. Rango.

*Control de calidad de la formulación QL.*

***Control tecnológico.***

*Evaluación organoléptica:*

Se evaluó la apariencia física del ungüento en cuanto a olor, coloración, arenosidad al tacto y el brillo de la forma farmacéutica.

***Extensibilidad***

Se adicionaron dos gramos del semisólido sobre una placa de vidrio donde previamente fue colocado por su parte inferior un papel milimetrado. Sobre la placa se colocó otra de iguales dimensiones e igual peso. A los cinco minutos se midió la distancia desde el punto de aplicación del semisólido a los

bordes de la misma en cuatro direcciones perpendiculares entre sí, y se determinó el área a través de la siguiente expresión.

$$A = \pi (d_1 * d_2) / 4$$

donde:

A: Área de la elipse formada (cm<sup>2</sup>)

d<sub>1</sub> y d<sub>2</sub>: Semidiámetros de la elipse formada (cm)

Se realizaron tres réplicas en cada medición.

***Control Químico***

Con el método volumétrico diseñado y validado para cuantificar el C.L en el ungüento QL se realizó el control químico de 3 muestras. Se determinó X y D.S.

***Resultados y Discusión***

El método reportado en la BP 2000 [11] para el análisis del gel de C.L que está en forma catiónica, lo cual se favorece en medio ácido (por lo que debe añadirse el buffer acetato a pH = 2,8) y el valorante: dioctil sulfosuccinato de sodio que es un agente aniónico. El resultado de esta reacción es la formación de un coacervado insoluble en agua. Por esta razón, la técnica requiere de la adición de cloroformo y por tanto el procedimiento conlleva una valoración difásica para evitar interferencia en la detección del punto final.

Se emplea un indicador mixto que indica el punto final cuando la coloración inicial del medio que es verde se torna gris rosácea. El color verde resulta de la combinación de los colores de los indicadores mezclados: el amarillo (del amarillo de metilo) y el azul (del azul de oracet B).

Al aplicarlo a nuestra formulación, se tuvo en consideración la presencia de Quitina y demás componentes, entre los que se encuentran los oleaginosos de la base. Estos pueden disolverse perfectamente en

la cantidad de cloroformo sugerida en la BP 2000 [11], ya que se trabajó con la cantidad de ungüento equivalente a 11mg de C.L que es 0,55 g, en la que solo tendremos 55 mg de Quitina. Al disolver el ungüento en cloroformo, se libera la Quitina que resulta mínima y, por tanto, prácticamente imperceptible. A diferencia del método oficial de la BP 2000 [11], nosotros preferimos añadir antes el cloroformo que el agua, para propiciar la disolución de los excipientes y la liberación de los principios activos. A pesar de que en los reportes bibliográficos se habla sobre las ventajas de los indicadores mixtos respecto a la nitidez del cambio de coloración, observamos en la practica ciertas dificultades para precisar el cambio a gris rosáceo. Realmente nos resulta difícil determinar con exactitud la diferencia entre el gris verdoso que aparece después del color inicial y el gris azulado, violáceo y finalmente rosáceo que plantea como punto final la Farmacopea.

En la Tabla 1, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

Según puede apreciarse, en general existen fluctuaciones en los resultados, lo cual se atribuye a la posibilidad de error debido a fijar incorrectamente el llamado “gris rosáceo”, pues como explicamos anteriormente, se observa en un intervalo pequeño de volumen un cambio de color tras otro entre tonalidades, a nuestro criterio, muy parecidas.

No obstante, el método parece ser específico frente a los excipientes debido a que fueron comparables los consumos de valorantes del blanco y de los placebos cargados con Quitina. De este modo, podemos atribuir la respuesta analítica exclusivamente al fármaco de interés: el C.L.

De igual modo fueron similares los porcentajes promedios de C.L para los

patrones y los placebos cargados con ambos fármacos. La variabilidad observada atenta contra la calidad de los resultados.

Tomando en consideración que la técnica reportada en la BP requiere muy poca cantidad de muestra, valoramos la posibilidad de realizar varias modificaciones.

Las modificaciones estaban encaminadas a:

- Reducir los gastos por concepto de cantidad de reactivos utilizados.
- Mejorar la precisión en la detección visual del punto final de la valoración.

Consideramos que los volúmenes de cloroformo propuestos por la BP 2000 [11] resultaron excesivos para disolver 0,55g de ungüento QL, por lo que se redujo el volumen añadido de 120 mL a solo 30 mL. Esto representó un ahorro de 90 mL de cloroformo por cada determinación, aspecto de gran importancia si tenemos en consideración los precios que actualmente tiene este reactivo en el mercado.

En consecuencia, fue necesario reducir el volumen de agua y de buffer proporcionalmente.

Por otra parte, las dificultades observadas para la detección del punto final con el indicador mixto, unido a la falta de disponibilidad del azul de oracet B, nos condujeron a sustituir el indicador por amarillo de metilo. El indicador propicia un cambio mucho más fácil de apreciar, de amarillo a naranja oro, que da resultados mucho más reproducibles, según se aprecia en la Tabla 2.

Indiscutiblemente, los resultados superan los obtenidos pues prácticamente no hay variación entre los mismos. Los porcentajes de C.L entre patrón y placebo

cargado al 100% no difieren y se notifica la especificidad del método frente a los excipientes y el otro principio activo: La Quitina.

El cambio de amarillo a naranja oro fue mucho más fácil de detectar que el del indicador mixto. Por tanto, las modificaciones realizadas contribuyen a la mejora de los resultados.

#### ***Validación del método modificado para el control de calidad***

Teniendo en cuenta la categoría a la que pertenece el método según el propósito para el cual se diseña, evaluamos los parámetros mínimos exigidos a tales efectos.

#### ***Especificidad para control de calidad***

En la Tabla 2, aparecen los resultados que ya fueron discutidos. Quedó demostrada de esta forma, la especificidad del método frente a los componentes de la matriz.

#### ***Linealidad del sistema***

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Se construyó una curva de calibración de concentración teórica (%) v/s concentración real (%) procesada por regresión lineal, según la Fig. 2.

Se cumplieron satisfactoriamente los criterios de aceptación establecidos, tal como se muestra en la Tabla 4.

El conjunto de estos resultados, permite afirmar que el sistema es lineal en el rango estudiado, por lo que existe adecuada proporcionalidad entre la respuesta obtenida por el método y la concentración del analito.

#### ***Linealidad del método, exactitud y repetibilidad***

En la Tabla 5, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de estos parámetros.

Al plotear concentración teórica v/s concentración experimental de los cinco puntos se obtiene la curva de calibración de la Fig. 3.

El análisis por regresión lineal, arrojó nuevamente resultados positivos en correspondencia con los criterios de aceptación estipulados. (Ver Tabla. 6).

Con los porcentajes recuperados de los puntos equivalentes al 50, 100, 150 % se construyó la curva de recuperación. (Ver Fig. 4).

#### ***Reproducibilidad***

Se obtuvo un C.V muy bajo, de modo que los errores aleatorios no repercuten significativamente en el método desarrollado (Tabla 7).

Este análisis se complementó con los test de Fischer y Student (Tablas 8 y 9)

En cada caso, no existen diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por los analistas. El conjunto de estos resultados permite asegurar que los resultados son homogéneos, ratificando la reproducibilidad del método.

El cumplimiento de las exigencias internacionales para la validación de técnicas analíticas permite concluir que la volumetría en sistema de dos fases, desarrollada para cuantificar C.L en el ungüento QL es suficientemente preciso, exacto, lineal y específico para el control de calidad en el rango de 50 a 150 % de la cantidad nominal declarada.

#### ***Control de calidad de la formulación QL.***

A continuación aparecen los resultados del control de calidad realizados al producto elaborado a escala de laboratorio (Tabla 10).

Aunque no existe un límite establecido para este parámetro en los semisólidos, consideramos que las áreas de

extensibilidad obtenidas corresponden con los ungüentos de mediana consistencia.

Las propiedades organolépticas apreciadas concuerdan con la descripción realizada por Méndez y col [1] para las formulaciones QL.

Se aprecia un ungüento sin grumos ni arenosidad, con brillo adecuado de color beige oscuro.

El contenido de C.L está dentro del rango permisible de 90 a 110 %, por lo que se comprueba que en el producto terminado, el C.L esta correctamente dosificado.

Finalmente, se puede concluir que se adaptó el método reportado por la BP 2000 [11] para el gel de C.L. a la cuantificación de este fármaco en el ungüento QL. Además, la sustitución del indicador mixto por el amarillo de metilo mejoró apreciablemente la calidad de los resultados analíticos relacionados con la precisión del punto final de la valoración. La reducción de los volúmenes de los reactivos consumidos en la técnica analítica representó una gran ventaja desde el punto de vista económico, disminuyendo significativamente los costos por este concepto. El método resultó suficientemente lineal, preciso, exacto y específico para ser aplicado en el control de calidad del ungüento QL en el rango de 50 a 150 %. El método sufrió interferencias analíticas de la o,o dimetilnilina, que es uno de los productos de hidrólisis del C.L., por lo que no es específico para estudios de estabilidad. El control tecnológico y químico realizado al ungüento QL arrojó resultados satisfactorios.

Se recomienda desarrollar y validar un método para cuantificar Quitina en el ungüento QL, desarrollar y validar los métodos para llevar a cabo los estudios de estabilidad química de ambos fármacos.

Realizar los estudios de estabilidad física, química y microbiológica del ungüento QL, dar inicio a los ensayos preclínicos y clínicos correspondientes para avalar la efectividad y seguridad del producto en el tratamiento del brote hemorroidal agudo.

### Referencias Bibliográficas.

- [149] Foye W. Principios de Química Farmacéutica. Parte II. Capítulo XIV, pp. 356-371; 1983.
- [150] USP DI Advice for the Patient. Drug information in lay language the United States. Pharmacopoeia Convention, Vol. II, 13<sup>th</sup> edition, pp. 90-80; 1993.
- [151] USP DI Advice for the Patient. Drug information in lay language the United States. Pharmacopoeia Convention, Vol. II, 13<sup>th</sup> edition, pp. 90-80; 1993.
- [152] USP DI. Información de medicamentos. Tomo I. Primera edición, p100,207,210;1988.
- [153] Zhong R;Sun X;Wang Q;Tang D;Li G.Quantitative determination of lidocaine hydrochloride and its injection by gran graphic metod and linear regression analysis.Yaowu-Fenxi-Zazhi;9(6):354-356;1989.
- [154] Kereichuk AS;Pantsurkin VI;Ptukha EV;Potemkin KD;Chekryshkina LA. Determination of trimecaine and lidocaine using an ion-selective electrode.Zh-Anal-Khim;45(3):569-574;1990.
- [155] Satake H;Miyata T;kaneshina S.Coated wine electrodes sensitive to local anaesthetic cations and their application to potentiometric determination.Bull-Chem-Soc-Jpn;64(10):3029-3034;1991.
- [156] Zhou X; Hu Q; Li Q ; Bi Y.Selective crown ether-poly (vinyl ehloride) membrane electrode for local anesthetics.Fenxi-Huaxue;20(1):58-60;1992.
- [157] Katakya R; Palmer S. Local anaesthetics measured by lipophilic beta-cyclodextrin-based ion selective electrodes. Electroanalysis (Ny), 8 (6): 585-590; 1996.
- [158] Zivanovic LJ;Agatonovic-Kustrin S; Vasiljevic M; Nercova I. Comparison of high-performance and thin-layer chromatographic methods for the assay of lidocaine.J-Pharm-Bio-Med-Anal;14(8-10):1229-1232;1996.
- [159] British Pharmacopoeia. London: The stationery office. Vol. II,pp. 2058-2061; 2000.

Recibido: 10 de septiembre de 2004

Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Resultados obtenidos en la cuantificación por el método reportado por la BP2000.**

Matriz	mL de valorante consumidos	% de C.L. obtenido	X±D.S.
Blanco	0,6	-	0,73mL ± 0,153
	0,9	-	
	0,7	-	
Patrón de C.L al 100 %	8,4	94,41	99,57 % ± 5,17
	9,0	102,16	
	9,0	102,16	
Placebo + Quitina al 100 %	0,6	-	0,76 mL ± 0,156
	0,9	-	
	0,8	-	
Placebo + Quitina al 100% + C.L al 100 %	9,0	102,16	102,86 % ± 1,212
	9,0	102,16	
	9,2	104,26	

**Tabla 2. Resultados obtenidos con el método modificado.**

Matriz	mL de valorante consumidos	% de C.L. obtenido	X±D.S.
Blanco	0,2	-	0,2 mL ± 0,00
	0,2	-	
	0,2	-	
Patrón de C.L al 100 %	8,5	98,82	98,82 % ± 0,00
	8,5	98,82	
	8,5	98,82	
Placebo + Quitina al 100 %	0,2	-	0,23 mL ± 0,06
	0,2	-	
	0,3	-	
Placebo + Quitina al 100% + C.L al 100 %	8,5	98,82	98,82 % ± 0,00
	8,5	98,82	
	8,5	98,82	

**Tabla 3. Resultados de la linealidad del sistema.**

Concentración teórica %	Concentración experimental %	f
50	49.41	0.9882
	49.41	0.9882
75	72.705	0.9694
	72.817	0.9702
100	98.82	0.9882
	98.82	0.9882
125	123.525	0.9882
	122.825	0.9835
150	147.525	0.9826
	147.645	0.9784

**Tabla 4. Resultados de la regresión lineal aplicada a la linealidad del sistema.**

Parámetros	Linealidad del método	Criterio
------------	-----------------------	----------

Ecuación de la recta	$y=0,9887x-0,5603$	$y = bx + a$
r	$r=0,99990$	$r \geq 0,99$
$r^2$	$r^2=0,99979$	$r^2 \geq 0,98$
Significación del intercepto	n= 8	$t_{exp} < t_{tab}$
$t_{exp}$	1,0446	
$t_{tab}$	2,306	No significativo
Significación de la pendiente.	b= 0,9887	$B \approx 1$
t	195.5018	t alta
p	0,0000	$p \leq 0,005$ , Significativa

**Tabla 5. Resultados de la evaluación de la linealidad del método, exactitud y repetibilidad.**

Concentración teórica (%)	Concentración experimental (%)	f	R (%)	C.V (%)
50	49,99	0,99	99,99	0,68
	49,41	0,98	98,82	
	49,41	0,98	98,82	
75	72,6	0,97	-	-
	72,7	0,97	-	
	72,8	0,97	-	
100	97,64	0,97	97,64	0,68
	98,82	0,98	98,82	
	98,82	0,98	98,82	
125	122,35	0,97	-	-
	122,35	0,97	-	
	121,76	0,97	-	
150	148,23	0,98	98,82	0,87
	145,99	0,97	97,33	
	148,23	0,98	98,82	

**Tabla 6. Resultados de la regresión lineal para la linealidad del método y la exactitud.**

Parámetros	Linealidad del método	Exactitud	Criterio
Ecuación de la recta	$Y = 0,9803x+0,0678$	$y = 0,9788x-0,6247$	$y = bx + a$
r	0,99976	0,99984	$r \geq 0,99$
$r^2$	0,99952	0,99968	$r^2 \geq 0,98$
Significación del intercepto	n=13	n=7	
$t_{exp}$	0,107	0,882	$t_{exp} < t_{tab}$
$t_{tab}$	1,770	2,305	No significativo
Significación de la pendiente.	b= 0,0678	b= 0,9788	$b \approx 1$
t	164,8144	149,2628	t alta
p	0,0000	0,0000	$p \leq 0,005$ , Significativa

**Tabla 7. Resultados de la reproducibilidad expresados en porcentaje de C.L.**

Días	Analista 1	Analista 2
1	97,64 %	97,64 %
	97,64 %	97,64 %
	97,64 %	97,52 %
	97,64%	97,64%
2	97,53%	97,64%
	97,41%	97,64%
		97,64%
Resultados: C.V = 0,078 %		Criterio C.V ≤ 30 %

**Tabla 8. Resultado del test de Fischer y de Student para la reproducibilidad entre analistas.**

Analistas	Media	Varianza (S)	Fischer (F)	t de Student
1	97,58	0,094	$F_{exp} = 3,66$	$t_{exp} = 0,93$
2	97,62	0,049	$F_{tab} = 5,05$	$t_{tab} = 2,23$

**Tabla 9. Resultado del test de Fischer y de Student para la reproducibilidad entre días**

Días	Media	Varianza (S)	Fischer (F)	t de Student
1	97,62	0,049	$F_{exp} = 3,66$	$t_{exp} = 0,93$
2	97,58	0,094	$F_{tab} = 5,05$	$t_{tab} = 2,23$

**Tabla 10. Resultados del control de calidad del ungüento QL**

Muestra	Área de extensibilidad (mm <sup>2</sup> )	Contenido de C.L. (%)
1	1734,94	100,32
2	1537,81	100,32
3	1517,39	100,16
X	1596,71	100,26
D.S	120,41	0,096
C.V (%)	7,50	0,096

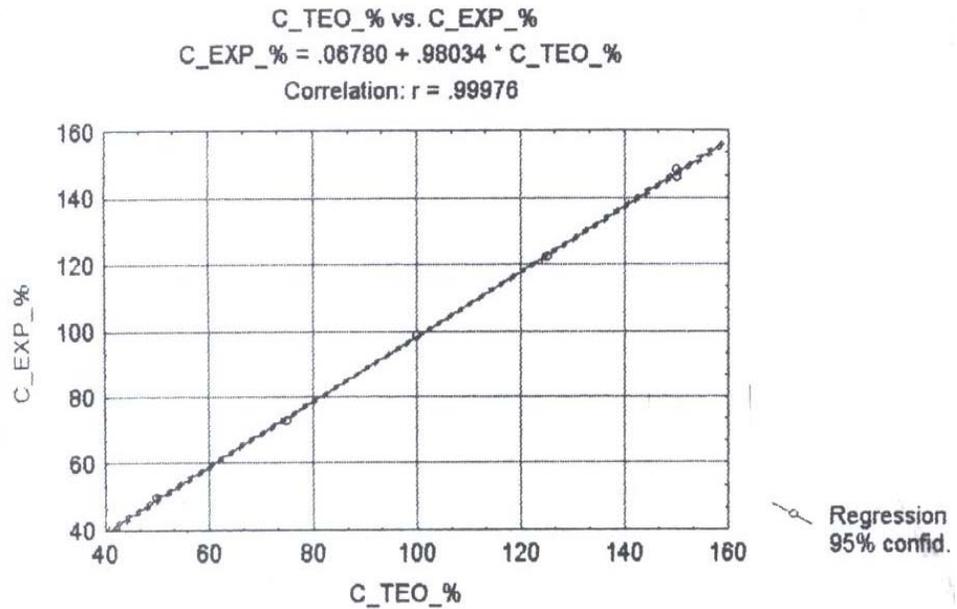


Figura 3 : Curva de calibración . Linealidad del Método .

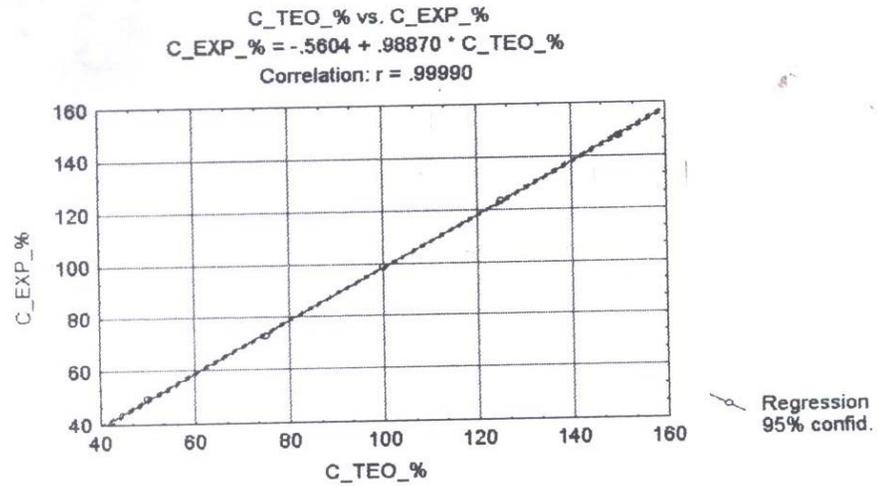


Figura 2 : Curva de calibración . Linealidad del Sistema.

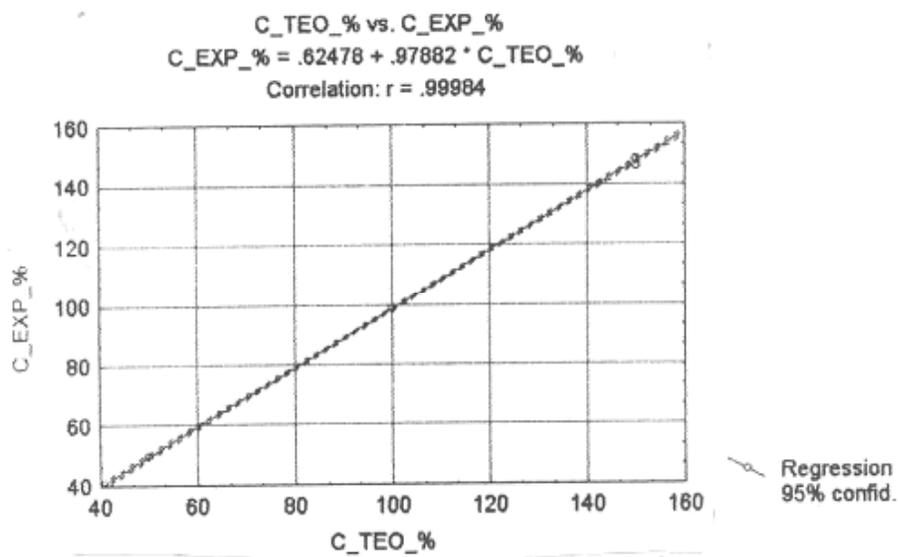


Figura 4 : Curva de recuperación. Exactitud del Método .

## Tesis de Grado

---

### *CONTROL DE LA DOCUMENTACIÓN EN LA AUTORIDAD NACIONAL DE CONTROL DE MEDICAMENTOS*

Lic. Gretel Frías Ferreiro; MSc. Ana Mayra Ysa Sánchez

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

#### **Resumen**

La norma ISO 9001:2000 establece que todos los documentos que forman parte del Sistema de Gestión de la Calidad deben ser controlados, es por ello que, para su implementación, las organizaciones deben trabajar en aras de diseñar un sistema que garantice un eficiente control de la documentación.

En este trabajo se propone la metodología para el diseño e implementación del Sistema para el Control de la Documentación, parte del Sistema de Gestión de la Calidad en el CECMED. Para esto se realizó un diagnóstico organizacional del estado de la documentación de acuerdo a lo que establece la norma ISO 9001:2000 y la documentación necesaria para la realización y control de los procesos de la Autoridad Nacional de Control de Medicamentos, que sirvió de base para la puesta en marcha del mismo y su posterior evaluación.

Con la aplicación de esta metodología se logró un salto significativo tanto cualitativo como cuantitativo de la documentación, generalizándose el control de los documentos a todas las áreas del Centro; además, permitió elevar el interés de los dirigentes por la misma y el incremento de la comunicación de los especialistas con el área de Aseguramiento de la Calidad. Este Sistema de Control de Documentos ha sido tema de entrenamiento de profesionales de la calidad de otras instituciones, por lo que los registros diseñados y utilizados en el mismo son aplicados actualmente en ellas.

**Palabras claves:** Norma ISO 9001:2000, Sistema de Gestión de la Calidad, Sistema de Control de Documentos.

#### **Introducción**

Las normas de la familia ISO 9000 describen los elementos que debe incluir un Sistema de Gestión de la Calidad

(SGC). El diseño y la aplicación del sistema de la calidad dependerán de las diversas necesidades de la organización, sus objetivos particulares, los productos y servicios que elabora y los procesos y prácticas específicas que emplea. En general, el criterio que debe prevalecer en toda empresa es el de asegurarse de tener un especial cuidado en todo lo que pudiera afectar la calidad del producto o servicio que se brinda y sobre todo garantizar al cliente que se cumplirán los requerimientos. Lo único que exige la norma es que la empresa diga lo que hace, haga lo que dice y lo demuestre con evidencias documentadas [1-3].

La documentación del SGC, debe incluir las declaraciones documentadas de una Política de Calidad y de Objetivos de la Calidad, Manual de calidad, Procedimientos y Registros documentados requeridos por la norma ISO 9001:2000 y los documentos necesitados por la organización para asegurar la eficaz planificación, operación y control de sus procesos [4-5].

El interés de la alta dirección por implantar nuestro SGC según las normas ISO 9000, conlleva a la necesidad de desarrollar e implantar un Sistema de Control de Documentos (SCD) en el Centro que permita la interrelación de nuestros procesos fundamentales y la

*171* Trabajo experimental

integración y el desempeño del personal  
para lograr la mejora continua.

Un sistema de calidad documentado implica el desarrollo y control de todos los documentos relativos a la calidad de todos los procesos que se realizan; asegurar la disponibilidad de la información para todo el personal que la requiere y demostrar, además, que se tiene un proceso de control de los documentos que incluya el acceso, la revisión y disposición de las versiones vigentes. Esto incluye la organización de la documentación de forma tal que permita la identificación y consulta rápida de la información; la conexión de los documentos que contienen información relacionada; un listado actualizado con la referencia de todos los documentos disponibles para el personal de la organización; un formato establecido para cada tipo de documento; las revisiones y aprobaciones de los documentos por personal autorizado y con suficiente experiencia e información en el tema; la actualización periódica de los documentos y en caso de cambios, que estos sean controlados y autorizados por las personas designadas [6-9].

Este trabajo tiene como objetivo el diseño e implementación del Sistema de Control de Documentos del SGC en el CECMED, donde actualmente se dirigen los esfuerzos hacia la gestión de la calidad, no solo para alcanzar los objetivos de la calidad, sino el objetivo de la organización en su conjunto.

### **Métodos**

Para el diseño e implantación del SCD se utilizó una metodología de trabajo por etapas (ver Fig. 1), la cual se presenta a continuación.

***Primera Etapa: Diagnóstico de la situación de la organización con relación al control de la documentación (1998-2000)***

En esta etapa para determinar la situación de la organización con relación al control de los documentos, se planificó la realización de un diagnóstico que nos proporcionaría una información de partida para la identificación:

- Todos los documentos operativos y técnicos que existían en las diferentes áreas.
- Los aspectos que incidían en el desarrollo del sistema de documentación (personal, Dirección, recursos, entre otras)

Concluido el diagnóstico, se desarrolló un plan de acciones con vistas a eliminar o disminuir las diferencias identificadas en el mismo.

***Segunda Etapa: Diseño e implementación del Sistema de Documentación (2001-2002)***

Esta etapa se caracterizó por la revisión del cumplimiento del plan de acciones elaborado en la primera etapa, con el fin de crear las bases para:

- Diseñar el SCD.
- Actualizar el procedimiento para el control de la documentación (PNO 00.001).
- Implementar el SCD diseñado.
- Emitir nuevos documentos.

***Tercera Etapa: Evaluación y Seguimiento del proceso para el control de la documentación (2003 a la fecha)***

En esta última etapa se propone la evaluación del sistema diseñado y el mejoramiento del mismo como parte del proceso de mejora continua.

### **Resultados y Discusión**

#### ***Primera Etapa***

Los resultados obtenidos en el diagnóstico realizado en 1998 fueron los siguientes:

- Insuficientes documentos aprobados teniendo en cuenta los requisitos de documentación que establece la norma ISO 9000 y las actividades que se realizan en el Centro.
- Existía un procedimiento para el control de la documentación (PNO 00.001, edición 02), que no reflejaba todas las actividades para este control que establece la norma de referencia tales como: período de actualización de los documentos, control de cambios, el formato para los registros, entre otros.
- Insuficiente personal para garantizar el control de la documentación y otras actividades relacionadas con el aseguramiento de la calidad, tales como la organización y control de la capacitación del personal y la metrología, lo cual atentaba contra una sistemática y eficaz organización de la documentación.
- La alta dirección no interiorizaba la necesidad de la implantación de un sistema de control de documentos.
- Insuficiente cultura organizacional con respecto al control de documentos.
- Las responsabilidades con respecto a la documentación no estaban claramente definidas.
- Deficiente comunicación con las áreas con relación a la documentación aprobada en el Centro.

El Plan de acciones que permitió fortalecer el proceso de control de documentos en el período de 1999 hasta el 2000 consistía en:

- Definir las necesidades de documentos en las áreas para todas las actividades técnicas y del sistema.
- Declarar explícitamente las responsabilidades con respecto a la

elaboración, revisión y aprobación de la documentación en el Centro.

- Fortalecimiento del grupo de Aseguramiento de la Calidad de manera que se garantizará el control, conservación y archivo de la documentación aprobada en el CECMED.
- Designar los documentadores por área para la custodia y control de los documentos de las mismas y como medio de comunicación entre las áreas y Aseguramiento de la calidad.
- Planificar seminarios, disertaciones y encuentros con las áreas con respecto al tema de calidad y haciendo énfasis en la documentación necesaria para un SGC adecuado.
- Actualizar el PNO 00.001 “Metodología para la elaboración, revisión, aprobación, distribución y actualización de los procedimientos normalizados de operación y de los registros” con el objetivo de incluir en la nueva edición el accionar sobre las dificultades detectadas.
- Poner a disposición de los especialistas toda la documentación aprobada en el Centro a través de la red interna.

### ***Segunda Etapa***

En la segunda etapa (2001-2002), como resultado del cumplimiento del plan de acciones, se logró una mayor interrelación entre las áreas y Aseguramiento de la Calidad; se elevó la cultura organizacional con respecto a la documentación del sistema de calidad en el Centro; quedaron designados los responsables de la documentación, siendo los jefes de áreas los encargados de planificar e identificar los documentos necesarios y velar por el cumplimiento de la elaboración, revisión y actualización de los mismos; y las

subdirecciones y la Dirección como responsables de la aprobación de la documentación del Centro.

Se actualizó el PNO 00.001 y se continuó en la identificación y elaboración de la documentación. Se incluyeron los manuales, las instructivas y los registros de instructivas como tipos de documentos del sistema, quedando estructurada así la base documental del CECMED (ver Fig. 2).

Los documentos se identificaron debidamente según los códigos establecidos de acuerdo al tipo de documento y al área que lo elabora, según se muestra en la Tabla 1. El código indica, además, el orden consecutivo del documento en el área.

En el caso de los registros, se codificaron de forma tal que permite relacionarlo con el procedimiento o instructiva de la actividad donde se utilicen.

Los documentos se actualizan periódicamente y se conservan en lugares seguros y de fácil y rápido acceso por lo que están disponibles para los especialistas que lo requieran o bajo condiciones de seguridad en el caso de que sean confidenciales. Se conservan por tiempo definido, declarándose en el momento de su aprobación.

En el año 2003 quedó implementado el sistema de control de la documentación en el CECMED (Fig. 3), partiendo de que todos los documentos necesarios para la realización de las actividades son identificados por los jefes de áreas, teniendo en cuenta los procesos que se desarrollan. Los títulos de los documentos son reflejados en un listado de acuerdo al tipo de documento, con código, título, edición, fecha de aprobación; y en la medida que son elaborados y aprobados se actualiza esta lista con el código del documento aprobado, la edición, fecha de

aprobación y la fecha de derogación en caso de que proceda. La actualización es responsabilidad del documentador, persona del área encargada de tramitar directamente con el responsable de la documentación del Centro, así como de garantizar la conservación adecuada de la misma.

A partir del listado de los documentos identificados, cada jefe de área planifica a principios de año (enero) la elaboración o actualización anual de los documentos junto con el área de Aseguramiento de la Calidad, la cual controlará el cumplimiento del mismo durante todo el año. Los documentos que excepcionalmente se elaboren fuera de lo planificado son controlados y solo se acepta esta condición después de un análisis de Aseguramiento de la Calidad con el jefe del área teniendo en cuenta la necesidad de su aprobación inmediata.

Los especialistas responsables de las actividades operativas y técnicas, elaboran los documentos y tendrán en cuenta los criterios emitidos por otros especialistas del área y del Centro relacionados con la actividad descrita. Son escritos de forma clara, legible, sin ambigüedades y están fechados y firmados por las personas que lo elaboran, revisan y aprueban. Además, son revisados por el jefe del área y Aseguramiento de la Calidad para comprobar la correcta descripción de los pasos y el uso del formato y estructura adecuados respectivamente. Concluida la revisión del documento se presenta a Aseguramiento de la Calidad para tramitar su aprobación y el responsable del control de la documentación del Centro es el encargado de presentarlo a aprobación, según el nivel establecido para cada documento.

Los documentos aprobados son controlados, conservándose el original en

carpetas destinadas para ello en el área de Aseguramiento de la Calidad, quedando conformado el Archivo Maestro. Los documentos no vigentes se conservan en el Archivo Pasivo, conformándose así la Historia del Documento. En esta área, además, se reproducen de forma cuidadosa los documentos en las cantidades necesarias para su distribución a las áreas involucradas con las actividades descritas en ellos, identificándose las copias como “copia fiel del original”; se controla y registra la distribución de copias a las áreas, lo cual garantiza la recogida y destrucción de las mismas una vez que no están vigentes. Estas copias están disponibles de forma segura en los lugares de fácil acceso para garantizar su cuidado y conservación siendo responsables de su custodia los documentadores por área.

La actualización de los procedimientos se lleva a cabo anualmente y en caso de las instructivas y los registros de instructivas se hará cada tres años como máximo. El sistema para el control de la documentación establece, además, las modificaciones urgentes a la documentación cuando no sea posible esperar a la actualización de esta, facilitando así la introducción inmediata de acciones para la mejora.

Existe un mecanismo para el control de cambios realizados a los documentos, que garantiza la identificación de estos, señalándolo en el cajetín de los PNO, según la página que se modifique con la firma y fecha de aprobación. Las modificaciones a cualquier documento se revisan y aprueban por los mismos niveles responsables de la revisión y aprobación del documento original. En la medida que se identifican, en cada área, modificaciones que no representen un cambio urgente del documento, éstas son registradas de forma independiente y se

conservan en el área hasta que corresponda la actualización del mismo.

Durante todo este proceso están implicados una serie de registros que se van llenando y supervisando según lo establecido, quedando así la evidencia de la realización de estas actividades.

Considerando las posibilidades que brinda la intranet del Centro para la factibilidad de información actualizada, en Aseguramiento de la Calidad se ha creado un sitio Web para brindar una rápida y efectiva información acerca del estado de los documentos referentes a la calidad a todos los especialistas del Centro. Este sitio facilita el acceso, desde cualquier máquina conectada a la red interna, al listado de los procedimientos, manuales, regulaciones, instructivas y registros que rigen las actividades de la Institución [10]. Esta forma de comunicación entre las áreas de la Institución y Aseguramiento de la Calidad, mejora en gran medida el acceso a la información, acerca del estado de la documentación de calidad del CECMED.

La aplicación del sistema de control de la documentación antes descrito ha permitido dar un salto significativo tanto en calidad como en cantidad de los documentos necesarios, lo cual se muestra en la Tabla 2.

### ***Tercera Etapa***

Del 2003 a la fecha, el área de Aseguramiento de la Calidad se encuentra en una etapa de seguimiento y mejoramiento del Sistema de Control de Documentos diseñado, durante la cual:

- Se continuó perfeccionando el PNO 00.001 y el PNO 00.002, elaborándose una nueva edición de cada uno de ellos para el control de la documentación.
- Los balances semestrales y anuales con el estado del cumplimiento del control de

la documentación de los diferentes departamentos, se entregan a los jefes de áreas, lo cual incide en un flujo adecuado para mejorar el comportamiento en cada área con relación a la misma.

- Se ha sistematizado el intercambio con los documentadores de las áreas.
- Se trabaja sistemáticamente en función de elevar la cultura del Centro, para lo cual imparte cursos anuales de SGC y disertaciones con relación al control de la documentación para todos nuestros especialistas.
- Se ha incrementado el intercambio con especialistas de otros centros del sector que laboran en esta actividad para la retroalimentación en el tema.

La base documental del CECMED en el período 2002-2003 alcanzó las cifras que se muestran en la Fig. 4. Estos valores desglosados por los diferentes procesos del CECMED se muestran en la Tabla 3.

Estos resultados demuestran, que el estado de la documentación en nuestro Centro en la etapa actual, alcanza valores que antes de la implementación del SCD no se habían obtenido.

Es válido aclarar, que el incremento de los documentos aprobados en nuestro Centro no se contradice con lo declarado en las normas ISO 9001:2000, de documentar solo lo imprescindible y no tener documentos en exceso. Estas cifras son debido a que desde el 2001, como se había mencionado anteriormente, se comenzaron a aprobar las instructivas, y los registros se comenzaron a controlar de forma independiente, lo cual ha aumentado la cifra de documentos aprobados. Actualmente, se analiza la factibilidad de introducir nuevos documentos al sistema como son: las listas de chequeo y los diagramas de flujo de manera que se simplifique la base documental.

## Conclusiones

En este trabajo se logró identificar una metodología para el mejoramiento del control de la documentación y se realizó el diagnóstico basado en los documentos que exige la norma ISO 9001:2000, que permitió conocer el estado de la documentación al iniciar el mismo. Se diseñó e implementó el sistema para el control de la documentación en el CECMED que ha contribuido a dar un salto significativo, tanto en calidad como en cantidad de los documentos aprobados; lograr un mayor interés de todos los dirigentes por el cumplimiento del Plan de elaboración de documentos; elevar tanto la comunicación entre los especialistas y el área de Aseguramiento de la Calidad, como la cultura organizacional; además de lograrse un incremento en la eficacia del proceso de control de la documentación, con relación a la etapa inicial de este control.

## Referencias Bibliográficas

- [1] Sitio Web: [www.InfoNegocio.com](http://www.InfoNegocio.com)
- [2] Normas NC ISO 9001:2000 Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos
- [3] Norma ISO 9004:2000 Sistemas de gestión de la calidad. Directrices para la mejora del desempeño.
- [4] Instituto Tecnológico de Canarias. Introducción a los Sistemas de Gestión de la Calidad, 2001.
- [5] Reyer, José Antonio. La nueva ISO 9001:2000 ¡por fin!. Forum Calidad (118). 2001
- [6] PNO 00.001 Metodología para la elaboración, revisión, aprobación, distribución y actualización de los Procedimientos Normalizados de Operación y de los Registros.
- [7] PNO 00.002 Metodología para la elaboración, revisión, aprobación, distribución y actualización de las instructivas
- [8] Pittaluga, Dr. R. R. Conferencias Documentación del Sistema de Calidad, 2003.
- [9] Sitio Web: [www.emprendedor.com](http://www.emprendedor.com)
- [10] Frías Ferreiro, Gretel. Sitio Web para la información efectiva de la documentación relacionada con la calidad.

Recibido: 10 de septiembre de 2004  
Aceptado: 20 de diciembre de 2004

**Tabla 1. Codificación de la documentación**

Código por tipo de documento	PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
	I	Instructiva
	REG.	Registro de PNO
	REG.-I.	Registro de Instructiva
Código por área	00	Gestión de la Calidad
	01	Dpto. Medicamentos
	02	Dpto. Diagnosticadores
	03	Inspección Farmacéutica Estatal
	04	Laboratorio de Control de la Calidad III (físico químico)
	05	Laboratorio de Control de la Calidad II (microbiológico)
	06	Dpto. Biológicos
	07	Regulaciones
	08	Centro de información Esp. Medicamentos (CIEM)
	09	Administración
	11	Dpto. Economía
	12	Laboratorio de Control de la Calidad I (Biológico)
	13	Investigación y desarrollo
	14	Dpto. Secretaría, archivo y Estadísticas
	15	Dpto. recursos humanos y Capacitación
	16	Informática
	17	Dpto. Productos Naturales y homeopáticos
	18	Farmacovigilancia
	19	Dirección

Tabla 2. Documentación del SGC del CECMED

Norma ISO 9001:2000	CECMED
Política de Calidad	Garantizar la confiabilidad en los medicamentos y diagnosticadores producidos nacionalmente o que circulen en el país, mediante la realización de un servicio eficaz, transparente y oportuno, en un clima de buenas relaciones humanas apuntando, a través del mejoramiento continuo, al logro de la satisfacción plena de los clientes internos y externos de la Institución
Objetivos de calidad	En elaboración
Manual de Calidad	En elaboración
Control de la documentación del sistema de la calidad Control de los registros de calidad	PNO 00.001 Metodología para la elaboración, revisión, aprobación, distribución y actualización de los PNO y de los Registros.  PNO 00.002 Metodología para la elaboración, revisión, aprobación, distribución y actualización de las instructivas y los registros de instructivas.
Realización de auditorías internas. Acciones correctivas	PNO 10.005 Procedimiento para la realización de auditorías internas de la calidad
Identificación y control de productos no conformes	Pendiente
Acciones preventivas	Pendiente
Documentos necesarios por la organización para asegurar la eficaz planificación, operación y control de sus procesos	Documentos de los procesos fundamentales del CECMED (482 en total)
Registros requeridos por la norma aplicables al CECMED:	
✓ Educación, formación, habilidades y experiencia	✓ Registro de Capacitación y docencia del personal
✓ Evidencias de que los procesos de realización y el producto resultante cumplen con los requisitos	✓ De todos los procesos que se desarrollan en el CECMED
✓ Identificación única del producto, cuando la trazabilidad sea un requisito	✓ Documentos de códigos aprobados por tipo de trámite
✓ Resultados de la calibración y la verificación del equipo de medición	✓ Registro de calibración y/o verificación
✓ Resultados de la auditoría interna y de las actividades de seguimiento	✓ Registro de control de auditorías realizadas
✓ Identificación de las responsables de la liberación del producto	✓ Pendiente
✓ Naturaleza de las no conformidades del producto y de cualquier acción tomada posteriormente	✓ Registro de no conformidades detectadas durante la auditoría
✓ Registros del control de la documentación	✓ Registros para la circulación, revisión, aprobación, distribución, destrucción, recogida y modificaciones
✓ Resultados de la acción correctiva	✓ Pendiente
✓ Resultados de la acción preventiva	✓ Pendiente

**Tabla 3. Documentos aprobados de los procesos fundamentales del CECMED**

Procesos	Documentos Aprobados			Total
	PNO	I.	Reg.-I.	
Evaluación y Registro	23	11	12	46
Inspección Farmacéutica Estatal	12	2	1	15
Autorización de Ensayos Clínicos	4	-	-	4
Liberación de lotes de vacunas	2	2	8	12
<b>Control Analítico</b>	121	116	105	342
Farmacovigilancia	3	3	-	6
Apoyo	54	1	2	57
				425

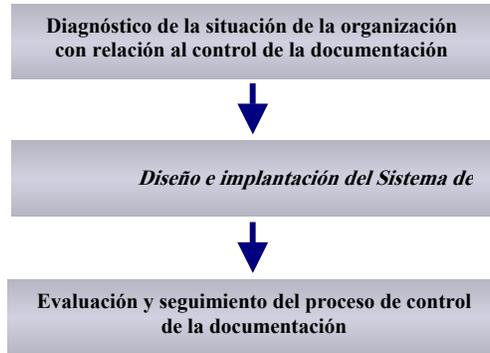


Fig. 1. Metodología utilizada para el diseño e implantación del SCD en el CECMED



Fig. 2. Base documental del CECMED

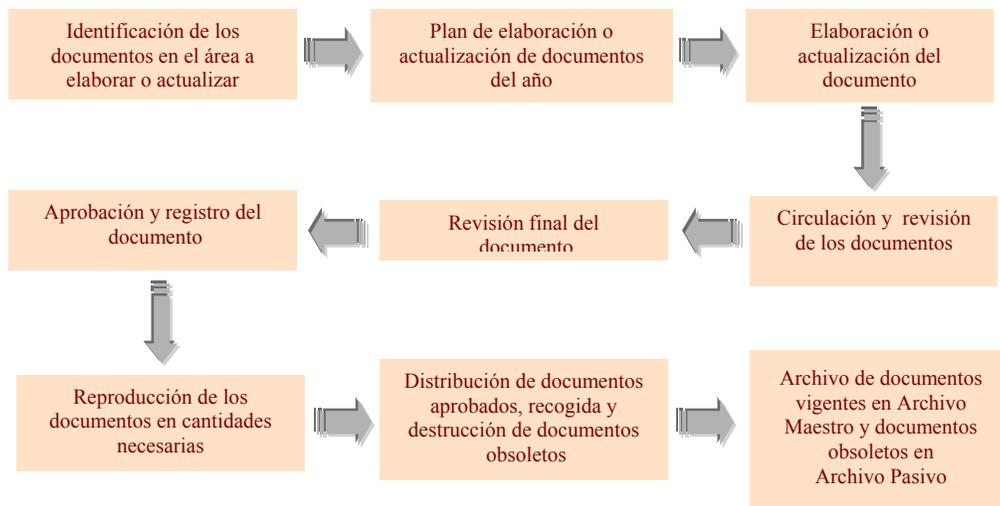


Fig. 3. Diagrama de flujo del proceso de control de documentos

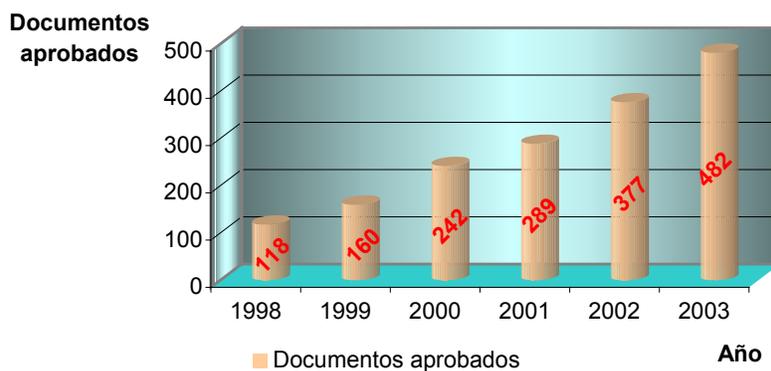


Fig. 4. Documentos aprobados en el CECMED

## Informativas

---

### ACTIVIDAD ACADÉMICA

Las características del CECMED como Autoridad Reguladora Nacional requiere de personal especializado y altamente calificado capaz de enfrentar y fortalecer relaciones y vínculos de trabajo con autoridades nacionales de otros países. Los profesionales, investigadores y técnicos des-arrollan su plan de superación enmarcados en los propósitos de su propia proyección académica; presentan y discuten sus resultados en eventos científicos; a la vez que comparten sus conocimientos mediante actividades docentes o de asesoría nacionales e internacionales. El personal administrativo, de servicios y mantenimiento, como parte del personal propio de la Autoridad Reguladora Nacional (ARN), recibe conferencias y entrenamientos con evaluaciones periódicas sobre Bioseguridad y Protección e Higiene del Trabajo.

#### Superación

Durante el año 2004, 185 trabajadores del CECMED participaron en 52 cursos y entrenamientos impartidos nacionalmente en instituciones del Polo Científico, centros universitarios y otras entidades; así como en diferentes procesos para la obtención de títulos académicos y grados científicos. También hubo una importante actividad en cursos y entrenamientos internacionales con 114 participaciones.

**En el ámbito nacional**, entre otros, se pueden destacar los siguientes:

- La defensa y obtención del grado de Doctor en Ciencias de una especialista con el tema: “Buenas Prácticas

Reguladoras. Un nuevo enfoque en el aseguramiento de Calidad del Sistema Regulador de Medicamentos”.

- Un especialista se encuentra en fase de preparación final de su Tesis de Doctorado con el tema “Desarrollo, implementación y evolución del Programa Nacional de Evaluación Externa de la Calidad en los Laboratorios Clínicos de la Atención Primaria de Salud (APS)”.
- La defensa y obtención del Grado de Master en Ciencias por dos especialistas, el primero en el tema “Establecimiento y Control Sanitario de importación a los Medicamentos de uso humano y a las materias primas farmacéuticas de origen animal” y el otro en un tema en la modalidad de Toxicología: “La nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt Jacob. Experiencia cubana en la aplicación de medidas sometidas para su control y prevención”.
- La evaluación positiva del tránsito académico de 16 especialistas que cursan Maestrías, de ellos 10 se encuentran en fase de redacción de tesis y el resto en clases lectivas.
- La participación de tres especialistas en dos diplomados: Calidad de los Laboratorios Analíticos y Aseguramiento de la Calidad.
- Dos técnicos medios se encuentran cursando estudios de nivel superior en las licenciaturas de Medicina Veterinaria y Bancos de Sangre.

- Seis especialistas recibieron entrenamiento en *Producción y control de productos biotecnológicos* en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB); *Validación Viral en el proceso de fabricación de Hemoderivados* en el Centro de Investigación Científica de la Defensa Civil; y *Formas Farmacéuticas Semisólidas* en la Empresa de Quimefa Laboratorio Farmacéutico Roberto Escudero.
- Por el sistema On Line se recibieron los siguientes cursos: 1) “Protección y Experimentación Animal para Investigadores en Ciencias Biomédicas” de la Universidad de Zaragoza España, con lo cual se logró que el especialista que lo recibió fuera promovido como profesor potencial para el curso 2005 para ser impartido en nuestro país y 2) “El correo Electrónico y su Uso Óptimo en la Búsqueda de Información” efectuado a nivel nacional por la Facultad de Ciencias Médicas de Holguín del Ministerio de Salud Pública.
- La celebración de 45 debates Científicos y Conferencias a diferentes niveles incluyendo las que se impartieron en la Primera Conferencia de Reglamentación Farmacéutica y I Taller de Diagnosticadores, en el marco de la celebración del XV Aniversario del CECMED,
- Se impartieron, además, 12 conferencias de tipo docente a los trabajadores administrativos, servicio y obreros.

**En el marco internacional**, el nivel científico técnico y de especialización de nuestros profesionales se consolidó aún más con la participación de 10 especialistas en los siguientes cursos y entrenamientos:

- Entrenamiento en Materiales de Referencia en la República Popular de China;
- Utilización de HPLC y Prueba de Disolución en el Control y Calidad de Medicamentos Antirretrovirales en Panamá;
- I Curso-Taller de Buenas Prácticas de Bancos de Sangre en América Latina, Argentina;
- X Curso Internacional de Aspectos Metodológicos del Registro de Medicamentos en Venezuela;
- Entrenamiento en Vacunas Combinadas, Bélgica,
- Técnicas de Control de Calidad de Vacunas Virales y Bacterianas, en Francia.

#### Eventos Científicos

La participación de 86 especialistas en eventos científicos nacionales e internacionales marcó también un aspecto importante dentro de las actividades del CECMED. Por citar algunos tenemos

#### Nacionales

- Taller Provincial de Control de Productos Naturales. Quimefa
- Primer Encuentro sobre los Recursos Humanos en Gestión Empresarial; Agencia de Información y Comunicación para la Agricultura (AGRINFOR)
- V Jornada Científica de Bibliotecas de Nuevo Tipo. Academia de Ciencias de Cuba.
- Primer Taller de Diagnosticadores. QUIMEFA-OPS-CECMED
- VIII Taller sobre el Trabajo de la Red de Laboratorios en el Diagnóstico del VIH en la Región Central. MINSAP, Laboratorio de Investigaciones del

SIDA. Programa Nacional de Prevención y Control de la Infección por VIH

- Taller Nacional Seguridad de la Sangre y sus Derivados; Hemoderivados, CECMED
  - IV Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.
  - Taller Nacional sobre Acreditación de Laboratorios, en Quimefa.
  - Congreso Provincial de Veterinaria. Instituto Nacional de Medicina Veterinaria.
- Internacionales**
- 2nd International workshop on vaccine adjuvant and glycoconjugates (Adjuvant 2004) Inmunología ALAI. Varadero. Matanzas. Cuba
  - VI Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimenticias. Cuba Farmacia-Alimentos 2004, La Habana, Cuba
  - Taller Internacional de Salud Mental. Ecología y Calidad en Proyección Comunitaria. MINSAP, Cuba
  - Taller Regional OPS/OMS sobre Buenas Prácticas para el Establecimiento de colectas de Sangre y plasma, en Buenos Aires, Argentina
  - 7th Annual Symposium of Canadian Pharmaceutical Sciences. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences (CSPS), Vancouver British Columbia, Canadá.
  - V Congreso Internacional de Patología Clínica y Primera Reunión Latinoamericana de Técnicos de los Laboratorios Clínicos. Sociedad Cubana de Patología Clínica. La Habana, Cuba.
  - V Jornada de Farmacia Clínica. Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ) y Centro Latinoamericano de Eventos Médicos (CELAMED).
  - II Congreso Internacional de Farmacología y Terapéutica, Ciudad de la Habana.
  - Foro Mundial de la Calidad del Instituto Latinoamericano de la Calidad 2004, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
  - Congreso Internacional de Ensayos Clínicos. CECMED. Hotel Palco. La Habana, Cuba.
  - II Taller Internacional de Diseño y Conducción de Ensayos Clínicos. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. CENCEC, Varadero, Matanzas Cuba.
  - Congreso Internacional de Avances en Cuidado y Uso de Animales de Laboratorios. OPS. Buenos Aires, Argentina.
  - Primer Simposium Internacional "Control de Calidad y Desempeño del Laboratorio Clínico en América. Asociación de Químicos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán A.C. México. D.F.
  - XI Conferencia Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos; OMS, Madrid, España.
  - La Evaluación preclínica de vacunas en Ensayos Clínicos; Causas de error en la apreciación de resultados preclínicos en la evaluación de trámites reguladores; y Programa de implantación de las Buenas Práctica de Laboratorio no Clínico. En Agencia Nacional Reguladora de Argentina.
  - Brief introduction of the activities carried out by the WHO collaborating center for Drug Quality Assurance and Quality control and quality assurance

system, Professor Jin Shaohong from National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, R. P China.

- Normalizativo y su relación con el enfoque regulatorio (del CECMED), con un resumen y perspectivas inmediatas para el país. Enfocado a ISO 15189. Día del Químico. México. D.F.

## Docencia

### *Nacional*

Se realizaron en el año múltiples actividades docentes de pre y postgrado, entre ellas, la participación en módulos de maestrías, cursos de pre y post grado y conferencias vinculadas con centros de nivel superior tales como el Instituto de Farmacia y Alimentos, Escuela Nacional de la Salud, Hospital Docente Salvador Allende y Escuela Latinoamericana de Ciencias Médicas de la Habana.

Además, la aceptación de cinco estudiantes de diferentes escuelas técnicas (Politécnico de Informática y Electrónica “José M. Castiñeira”, Escuela de Economía “Lázaro R. Alpizar” y el Instituto Politécnico de Química e Informática “Mártires de Girón”) para realizar prácticas docentes; y de dos estudiantes de pre-grado de la Universidad de Farmacia y Alimentos, para realizar las prácticas de curso en los Laboratorios de Control de la Calidad de Biológicos y posteriormente, discusión de sus tesis con resultados satisfactorios. También, dos técnicos medios insertados, uno de la especialidad de Farmacia Industrial y, otra de Secretariado.

El CECMED organizó e impartió en este año los siguientes cursos nacionales:

- Curso Taller Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico para Inspectores. Se desarrolló en enero, sus objetivos fundamentales fueron capacitar en los conceptos de calidad y los requisitos vigentes de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínicos a los jefes y especialistas de los laboratorios clínicos que apoyan o participan en ensayos clínicos de medicamentos. Esto, para que puedan evidenciar su competencia y aptitud para realizar los ensayos analíticos, contribuyendo así a

evidenciar la transparencia y credibilidad de los resultados de los ensayos clínicos.

- Validación de Métodos analíticos, se impartió en el CECMED en julio, con 24 especialistas del Centro y otros de la Industria Farmacéutica. Los objetivos estuvieron dirigidos a actualizar al personal del CECMED en materia de validación de métodos analíticos y compartir conceptos y principios definidos en la nueva regulación de validación antes de su puesta en circulación oficial.
- Utilización de Cultivos celulares en Laboratorio de Control de la Calidad. Se desarrolló en el CECMED en marzo y participaron 14 especialistas de los laboratorios del Centro. Sus objetivos fueron desarrollar habilidades para el trabajo con cultivos celulares en los Laboratorios de Control de la Calidad de Medicamentos
- Buenas Prácticas en la Industria Farmacéutica. Se realizó en el Instituto de Investigaciones de Normalización (ININ), en mayo y estuvo dirigido al personal de todas las empresas del país en Perfeccionamiento Empresarial. Fueron filmadas para cumplir este objetivo.
- Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos (BPLCM). Se desarrolló del 29 de noviembre al 3 de diciembre del 2004. Participaron 24 especialistas del CECMED, entidades del Polo Científico, centros de la Industria de Medicamentos y Productos Biológicos. Sus objetivos fueron dar a conocer los temas actualizados de Buenas Prácticas y Sistema de Calidad en Laboratorios en la nueva regulación del CECMED 37-2004 “Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Medicamentos”.

- Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico. Curso-taller para inspectores. Se desarrolló en el CECMED, en Octubre del 2004, con una participación de 23 expertos fármaco-toxicológicos, inspectores, auditores de los laboratorios no clínicos y a los estudiantes de la Maestría de Toxicología Experimental. Sus objetivos fueron ofrecer una base teórica acerca de los sistemas de calidad e ingresar los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no clínico a la actividad práctica de los inspectores e inspeccionados.
- Curso-Taller Sistemas de Gestión de la Calidad. Normas ISO 9000. Se desarrolló en el CECMED en noviembre. Participaron un total de 25 especialistas del propio Centro y otras Entidades del Polo involucrados en el desarrollo e implantación de un Sistema de Gestión de la Calidad. Los temas abordados tuvieron el fin de Introducir a los participantes en esta temática, abordar definiciones y términos e intercambiar con los especialistas sobre la importancia de implantar un SGC, el papel de todo el personal involucrado y del cuadro administrativo en la asimilación e implantación de un SGC.
- Manejo de Riesgo y Farmacovigilancia. Se realizó en el CECMED, en noviembre y diciembre, participaron un total de 19 médicos, farmacéuticos y otros profesionales relacionados directamente con la farmacovigilancia y la evaluación de riesgo y seguridad de los medicamentos y vacunas en etapa pre y post comercialización. El fin perseguido fue contribuir al fortalecimiento de la Autoridad Reguladora de Medicamentos cubana que aprueba y controla un número importante de ensayos clínicos,

en lo que respecta al desarrollo del sistema de farmacovigilancia.

- Curso Taller Internacional Urgencia Homeopática. Se desarrolló en el CECMED, en mayo y junio, con 18 médicos especialistas en MGI y Medicina Natural y Tradicional, con los objetivos principales de abordar desde una perspectiva histórica el concepto de similitud en medicina, historia de Hanneman y de la homeopatía, además de los principios generales. Conocer los principios para el análisis de casos. Conocer la farmacodinamia de los medicamentos homeopáticos para el tratamiento del caso agudo.

### ***Internacional***

Las actividades de docencia en el plano internacional formaron parte de los objetivos trazados para el 2004. El desarrollo de las relaciones de intercambio con ARM de otros países propició realizar los siguientes cursos:

- Funciones Básicas de las ARM para el control de vacunas. Este curso constó de dos ediciones, la primera se desarrolló en el Hotel Palco de Perú, en agosto y septiembre, con la participación de especialistas de la ARM de Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú y Ecuador. La segunda edición se impartió en noviembre, en Honduras, con la participación de especialistas de las ARM de Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, México, República Dominicana y Estados Unidos; con el objetivo que los participantes fueran capaces de identificar las partes esenciales de un dossier para solicitar el registro de una vacuna.
- Evaluación Clínica de Productos Biológicos. Se desarrolló en el Hotel Palco, Ciudad de la Habana, en octubre,

con 25 participantes de Argentina, Chile, Bolivia, Colombia, Brasil, Cuba, Canadá y Venezuela. Estuvo dirigido a médicos, farmacéuticos u otros profesionales de las ARM relacionados directamente con la evaluación de las solicitudes de autorización y modificación de ensayos clínicos y con la evaluación de los resultados de estos estudios para la obtención o renovación de Registro; todo con el objetivo de contribuir al fortalecimiento de las ARM de los países de la región donde se están realizando un número importante de ensayos clínicos en la actualización de la evaluación de ensayos clínicos; e introducir a los participantes en la importancia, impacto y puntos focales para la autorización de ensayos clínicos en humanos como parte del desarrollo e investigación de un medicamento y su interrelación con el registro de medicamentos.

#### **Asesoría Internacional**

Como asesor temporero de la OMS/OPS, se participó en las siguientes asesorías:

- WHO procurement and sourcing Project: accesses to anti malarial, anti tuberculosis and HIV/AIDS Drug and diagnostics of acceptable Quality. Copenhague, Dinamarca
- WHO consultation Stability studies in a global environment. Ginebra, Suiza.
- Inter.-regional meeting to revise data collection tool used for review of National Drug Regulatory Systems. Addis Abeba, Etiopía.
- Asesoría brindada a 23 graduados farmacéuticos de la Universidad de Guayaquil sobre Técnicas de Farmacología Preclínica para el Registro de Medicamentos. Ecuador.

#### **Consideraciones finales**

El desarrollo de la actividad de superación postgraduada del Centro, como parte de su estrategia en el perfeccionamiento del cumplimiento de su misión como Autoridad Reguladora Nacional, está encaminada a sistematizar e integrar las vías, formas y modalidades docentes para elevar el nivel científico-técnico y el grado de especialización de su personal, tanto en nuestra entidad como en industrias y otros centros que lo solicitan.

El año que culmina está pleno de resultados satisfactorios, ya que sobrepasó el nivel de expectativas en relación con otros años en la docencia y superación realizada por nuestros trabajadores para elevar el nivel investigativo, científico-técnico y la profesionalidad en general. Esto se puso de manifiesto también en el incremento de participación en cursos de carácter internacional y nacional. Nuestra proyección para el próximo quinquenio será el logro del liderazgo profesional, para lo cual el plan de superación de nuestra entidad será remodelado, atendiendo a lo que hemos llamado “Tarea Futuro”, que en esencia, consiste en llevar al CECMED a planos de excelencia gerencial.

## ¿CÓMO PUBLICAR?

### *Estimado Colega:*

Por la presente informamos a usted, que como parte de su política editorial, el CECMED distribuirá en el primer trimestre de cada año el Anuario Científico, dedicado a publicar artículos relacionados con la actividad de Reglamentación Farmacéutica de autores nacionales, de otros países y de organizaciones vinculadas a la temática. Esta constituye su segunda edición, Anuario Científico, 2004.

Para complementar su distribución y garantizar en el tiempo previsto la calidad de su proceso de revisión, edición e impresión necesitamos que las propuestas de artículos nos sean enviadas antes del día 15 de septiembre de cada año.

Le adjuntamos el formato requerido para ello.

- Reseñas y logros de la investigación y su desarrollo, hasta 14 cuatillas.
- Resultados de trabajo experimental y resúmenes de trabajos para tesis de grado científico, hasta 12 cuatillas.
- Otros artículos de divulgación o comunicaciones (noticias), hasta 6 cuatillas

Los trabajos deben escribirse a doble espacio, con márgenes no inferiores a 2,5 cm y de 28 a 30 líneas por cuatillas en letra Time New Roman 123 puntos. Cada línea debe tener 60 golpes de máquina para un total en la cuatilla de 1800 caracteres.

Todas las páginas se numeraran con arábigos y consecutivamente a partir de la primera. La versión impresa debe acompañarse de un disquete de 3,5 pulgadas en lenguaje Microsoft Word, sin sangría, tabuladores o cualquier otro atributo de diseño (títulos centrados, justificaciones, espacios entre párrafos, etc). El disquete se le devolverá al autor.

Partes preliminares. Contendrá el título del artículo que no excederá las 15 palabras, debajo, el nombre y apellidos de los autores ordenados según su participación y en número no mayor de 6. Cada nombre irá precedido del último nivel académico alcanzado (DrC., DrCs.) o maestría (MSc), y seguido de un número volado, a partir del 1 y de forma consecutiva que identifique la institución a la cual pertenece el autor. Si el número de autores fuera mayor de 6, se aclarará por escrito y en hoja aparte, el aporte de cada uno en la investigación o preparación del artículo.

Finalmente, y debajo del nombre de los autores, aparecerá el nombre completo de la institución correspondiente con el número volado al final, igual al que aparece en los autores que coincida con estos de acuerdo con la institución en cuestión.

El trabajo se inicia con el resumen que debe ser informativo de 150 palabras como máximo, contentivo de los propósitos, procedimientos empleados, resultados más relevantes y principales conclusiones al igual que cualquier otro aspecto novedoso. Se presentará a espacio simple.

El autor reflejará el contenido del documento a partir de 3 a 6 términos (palabras claves) al pie del resumen y en orden de importancia. Por su parte, el CECMED insertará los descriptores correspondientes a la indización de cada trabajo.

Partes del cuerpo. A doble espacio y a partir de las palabras claves, el autor desarrollará los párrafos que necesite para explicar el problema a investigar, presentar los antecedentes de los hechos hasta el momento de acuerdo con la bibliografía pertinente y definir los

objetivos. Hay que manifestar de forma breve y clara cuál es el propósito al escribir el artículo.

Métodos. Se presentan las descripciones generales de los métodos empleados. Incluye los métodos estadísticos. Se escribe en tiempo pasado.

Resultados. Es la parte esencial del artículo. El texto es la forma principal de presentar los resultados, los cuadros, tablas y figuras se usan para reforzar la información, no para duplicarla.

Las fotografías, gráficos, dibujos, esquemas, mapas, se denominarán figuras, tendrán numeración arábiga consecutiva y se identificarán con su correspondiente pie de figura. Las tablas llevarán el título en la parte superior. Tanto el título como el pie, se escribirán en cursiva y sin punto final la primera. Ejemplo:

Tabla 1. Actividad antimicrobiana demostrada en plantas.

Fig. 1. Curva de crecimiento del hongo *Aspergillus nidulans*.

Las tablas deben elaborarse en Word, no en autoformato, no deben tener colores ni rellenos. Tanto las tablas como las figuras deben ubicarse al final del trabajo, en forma vertical, numeradas consecutivamente y mencionadas en el texto, es decir, no se intercalarán en el artículo.

El total de tablas y figuras ascenderá a 5 en cada trabajo. Los cuadros tienen el mismo formato que las tablas.

Los resultados se escriben en tiempo pasado.

Discusión. Debe ser un análisis de los resultados expuestos dentro de los conocimientos existentes sobre el tema. No debe repetir la información recogida en los resultados ni en la primera parte del cuerpo del trabajo. En este acápite, los tiempos verbales oscilarán constantemente entre el presente y el pasado.

Resultados y discusión, deben presentarse separados, toda vez que sea posible y dada las características del trabajo.

Conclusiones. No se presentarán aparte, sino como un párrafo conclusivo al final de la discusión.

Partes finales. Contendrá las referencias bibliográficas, los agradecimientos, anexos, apéndices.

Referencias bibliográficas. Se acotan en el texto del artículo numeradas en arábigo, consecutivamente según orden de aparición y en forma de superíndice. Después del párrafo conclusivo aparecerá la relación de estas referencias en el mismo orden del texto con un máximo de 6 autores, más de esta cifra, se pondrá la expresión "et al".

Se observará el ordenamiento de los elementos bibliográficos y el uso de los signos de puntuación prescritos en las normas de Vancouver.

Los agradecimientos se escriben entre el final del trabajo y el listado de las referencias, de forma breve y concisa.

Tanto el cuerpo como las partes finales, se escribirán a doble espacio en Times New Roman 12.

Sistema Internacional de Unidades (SI). Todos los resultados de laboratorio y otros, se informarán en unidades del SI o permitidas por este. Si se desea añadir las unidades tradicionales, estas se escribirán entre paréntesis.

Abreviaturas y siglas. Las precederá su nombre completo la primera vez que aparezcan en el texto. No figurarán en títulos ni resúmenes.

Los autores de Ciudad de la Habana, de otras provincias del país y residentes en el extranjero pueden enviar sus trabajos a:

[Saiz@cecmmed.sld.cu](mailto:Saiz@cecmmed.sld.cu)

[cecmmed.@cecmmed.sld.cu](mailto:cecmmed.@cecmmed.sld.cu)

Consejo Editorial