

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS.

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS USED IN THE QUALITY CONTROL OF BIOTECHNOLOGY PRODUCTS

Rosales¹ I., Poutou² R., Arias³ J.

Las biotecnologías modernas, no sólo se han ocupado del diseño de ingeniosos procesos productivos para la obtención de metabolitos de interés, o de la novedosa manipulación genética de microorganismos como la *Escherichia coli*; si no que ha establecido una serie de normas para el control de la calidad de los productos biotecnológicos. Algunas de estas normas están encaminadas a garantizar la reproducibilidad y especificidad de las técnicas analíticas empleadas en el control de calidad, a través de la validación.

Desde la década del 70, el término validación y su significado conceptual han jugado un importante papel en la producción y aseguramiento de la calidad de los productos biotecnológicos. En éste sentido, la acción de validar involucra de manera progresiva una serie de procedimientos, cuyas complejidades son muy diferentes; entre los que encontramos la validación de las técnicas analíticas, de procesos de producción asépticos y no asépticos, de procedimientos para el tratamiento de las aguas y más recientemente la validación de los sistemas computarizados.

Validar consiste en establecer una evidencia documentada que permita asegurar la consistencia de un procedimiento, a partir del cual se pueda obtener un producto que satisfaga de manera consistente las especificaciones de calidad predeterminadas por el productor (Desain, 1992). Validar las técnicas analíticas permite conocer si las mismas son apropiadas para el análisis del sustrato a identificar y/o cuantificar, además de brindar información acerca de la precisión y exactitud inherente al método en estudio.

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de los métodos analíticos empleados en el control de calidad es un requisito indispensable dentro de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), cuyo cumplimiento es un factor decisivo para garantizar la

calidad de los productos o procesos controlados por estos métodos (Rosales, 1992).

Para proceder a la validación de una técnica analítica debe conocerse si esta es confiable y aplicable, con el objetivo de lograr la identificación y/o cuantificación del analito, debiendo ser ubicada en una de las cuatro categorías siguientes (Thomas, 1991).

A-Métodos cuantitativos para la determinación del compuesto activo como materia prima o en formulaciones farmacéuticas.

B-Métodos cuantitativos para la determinación de impurezas.

C-Métodos de identificación.

D-Métodos para determinar el límite de impurezas.

Una vez ubicada la técnica en una de estas categorías podremos conocer cuales son los parámetros que deben ser medidos para realizar la validación de la misma (Tabla 1). Validar implica, una serie de factores que se anteponen a la ejecución de la técnica y que discutiremos a continuación.

Entrenamiento del personal

Los analistas encargados de la ejecución de la técnica deben tener vastos conocimientos sobre las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), la bioseguridad y el manejo del equipamiento, además, haber aprobado cursos de superación en computación, estadística y cualquier otra materia afín con el trabajo que desempeñan. El analista es el factor fundamental para poder validar una técnica, siendo indispensable que éste comprenda la necesidad, importancia y ética de su trabajo, principalmente cuando se trata de validar técnicas

¹ Farmacéutica, MSc Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 131 entre 158 y 190 Cubacán, Ciudad de La Habana Cuba.

²Bioquímico, Especialista en Control de Medicamentos, Profesor Asistente. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

³Bacterióloga, Profesora Asistente.Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Jevariana

destinadas al control de productos farmacéuticos (Rosales et al, 1994).

Tabla 1: Parámetros a medir según la categoría que ocupe el método analítico

CATEGORIAS	METODOS			
	A	B	C	D
Especificidad	x	x	x	x
Linealidad	x	x	-	-
Exactitud	x	x	O	-
Repetibilidad	x	x	-	-
Límite de detección	-	x	-	x
Límite de cuantificación	-	x	-	O
Precisión	x	x	x	x

xe564Å

O= opcional

Mantenimiento y Calibración del equipamiento.

El estado del equipamiento es importante para el desempeño de una técnica por lo cual se requiere de un programa de mantenimiento y calibración que se ejecute por un personal calificado y con la periodicidad necesaria según la frecuencia de explotación de cada equipo. En algunos casos es necesario realizar la validación completa del funcionamiento del equipo pero en cualquiera de ellos el ajuste, limpieza y/o calibración será registrado cronológicamente, debiendo encontrarse disponible esta información a efectos de auditorías, inspecciones y rastreos de resultados (Mesley, 1991).

Protocolo de Métodos Analíticos (PMA).

Este documento debe ser escrito por el analista, explicando la técnica a profundidad, lo que implica normas de seguridad, principios, equipamiento que emplea, preparación de soluciones, ejecución de la técnica, referencias bibliográficas y aprobación. El PMA debe estar actualizado, exento de ambigüedades y emplear un lenguaje claro. Una vez confeccionado y aprobado el PMA, quedará terminantemente prohibida la violación y/o alteración del mismo sin previo estudio y/o consulta con las instancias correspondientes.

Patrones de referencia.

La utilización de patrones de referencia es de vital importancia, sin estos el análisis no sería confiable; por ello se hace necesario tener un procedimiento para la valoración y certificación de patrones de referencia primarios y secundarios, basado en la comparación contra patrones certificados adquiridos de organizaciones e instituciones internacionales acreditadas al efecto. Es importante también la conservación de los certificados que avalan la estabilidad y características del patrón de referencia internacional (Buik et al, 1990).

Criterio de aceptación de la muestra problema.

Es conocido que el volumen de muestra, la dilución, los componentes de las soluciones tampones, el pH, la temperatura, la osmolaridad y la turbidez, pueden afectar

el resultado de una técnica analítica (Carr, 1990). Las características de la muestra deben estar reflejadas en el protocolo de validación, en conjunto con las posibilidades y limitaciones del método en lo que a interferencias se refiere. Conocer la estabilidad de la muestra de ensayo permite establecer las condiciones de almacenamiento de la misma y el tiempo máximo que pueden permanecer en estas condiciones, antes de ser sometidas al estudio.

Control de las materias primas.

La eficiencia del ensayo, depende de la calidad y del control de los reactivos que intervienen en la realización de la técnica; por lo que es necesario conocer y controlar a través de los números de parte, las especificaciones de calidad de cada materia prima, para detectar las inconsistencias de los proveedores y hacer las sustituciones pertinentes en el momento adecuado (Rosales et al 1994).

Estabilidad de las soluciones.

Las condiciones de almacenamiento que garantizan la estabilidad de las soluciones deben ser estudiadas en el tiempo de uso, de forma tal que se puedan obtener los datos de caducidad. Estas soluciones deben ser preparadas utilizando materias primas de proveedores reconocidos y que tengan su certificado de garantía.

Dentro de los reactivos del laboratorio las aguas son el elemento más importante pues están formando parte en casi todas las soluciones, debiendo controlarse la presencia de agentes inhibitorios, la carga microbiana, la conductividad y el pH. Todas estas soluciones deben estar correctamente identificadas con el nombre de la solución, pH, concentración, fecha de preparación, fecha de vencimiento, número de lote, condiciones de almacenamiento y nombre del analista que las preparó.

Protocolo de validación.

No es más que el plan experimental diseñado para que al ser ejecutado se convierta en evidencia de que el sistema ha sido validado. Dicho plan debe incluir una definición del sistema a validar e identificar cada parámetro a estudiar, la forma de medirlos, la forma de monitorearlos, así como los criterios de aceptación. El protocolo de validación es específico para cada método y/o elemento a determinar o identificar, debiendo estar fechado y firmado por las personas responsables de la validación y de su aprobación (Rampazzo, 1990).

REALIZACION DE LA VALIDACION

Una vez que el personal calificado al efecto realiza la técnica siguiendo las indicaciones de las PMA, todos los datos primarios deben ser colectados y evaluados mediante la utilización de los métodos estadísticos apropiados. Estos resultados pueden diferir de los esperados, si esto ocurriese se hace necesario añadir un anexo al protocolo de validación, explicando los cambios introducidos con respecto al protocolo de validación original

y las razones que lo justifican (Poutou. et al 1993; Candelario et al, 1994).

Informes técnicos.

La manera de reportar los resultados de una validación es a través de la confección de informes técnicos, los cuales deben incluir:

- Referencias de la calibración y calificación de los instrumentos utilizados, así como los resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad antes de iniciar el estudio de validación.
- Referencia al Procedimiento Patrón de Operación del método objeto de la validación.
- Referencias de los patrones de referencia empleados.
- Resultados de las mediciones de cada parámetro.
- Discusión de los resultados y conclusiones.

Certificado de validación y archivo

Un certificado de validación o documento formal de aprobación firmado por las personas responsables debe ser emitido por la dirección de aseguramiento de la calidad de la empresa o laboratorio y los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante todo el tiempo de vida del producto.

Monitoreo de la técnica analítica.

En el procedimiento de validación y/o procedimiento de ensayo, debe indicarse la forma de monitorear cada parámetro medido, esto puede incluir el análisis de blancos, controles negativos, control de reactivos y/o calibración de instrumentos de medición; con el objetivo de asegurar que el ensayo no se desvíe de los criterios con que fue fijado en el procedimiento patrón de operación y en el procedimiento de validación de la técnica.

Esto permite evaluar la variabilidad de los analistas en las

actividades de verificación del método (Rosales I. et al 1994).

REVALIDACION.

La revalidación de un método analítico debe hacerse ante cambios en el equipamiento, de reactivos, analistas, etc. En el curso de operaciones normales pueden producirse modificaciones menores que generen resultados deseables, por ejemplo una ligera modificación en el pH. Este tipo de modificaciones ligeras deben ser sometidas a una validación, si el cambio es pequeño se puede aceptar la comparación entre los resultados obtenidos en una corrida normal y los resultados obtenidos en otra que incluya la modificación. Por otra parte si las modificaciones son mayores deben validarse todos los parámetros aplicables al ensayo (Candelario et al, 1994).

Para que una modificación mayor o menor se adopte, debe formar parte del Procedimiento Patrón de Operación, lo cual pudiera ser incluido en un anexo, o si se considera necesario, en una nueva edición del PMA, debiéndose documentar todo el estudio que permitió arribar a esas conclusiones (Buik et al 1990; Rampazzo, 1990).

PARTICULARIDAD DE LA VALIDACION.

Los métodos oficiales descritos en Farmacopeas, guías dictadas por organizaciones como la Association of Official Analytical Chemistry y reportes técnicos de la Organización Mundial de la Salud, entre otros, no requieren una validación obligatoria, sólo se recomienda evaluar la precisión bajo condiciones normales de operación.

Trabajar con técnicas correctamente validadas debe ser el estandarte principal de cualquier instancia encargada del control y aseguramiento de la calidad de productos biotecnológicos (Rosales et al 1994).

BIBLIOGRAFÍA.

- Buik A.R., Doig M.V., Jeal S.C., Land G.S. and McDowall R.D.** 1990. "Method Validation in the Bioanalytical Laboratory". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 8 N8-12 (629-637).
- Candelario Maida; Rolo Felipe; Nazábal Marcelo; Poutou Raúl A.; Amador Eladio y Quintana Marisel.** 1994 "Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Validación para el Uso en el Control de Calidad de Hemoderivados" Biotecnología Aplicada vol 11 # 1, 75 - 77.
- Carr G.P. and Wahlich J.C.** 1990. «A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis». Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 8 N8-12.
- Desain C.** 1992. Documentation basics. "Master Method Validation Protocols". BioPharm. June, 30-34.
- Mesley R.J., Dennis Pocklington W. and Walker Ronald F.** 1991 "Analytical Quality Assurance". Analyst, October Vol. 116, 975-988.
- Poutou, R.A.; Candelario, M.; Nazábal, M.; Pérez, C.** 1993 "Montaje y validación del Dot-Blot para la determinación de ADN de ratón en anticuerpos monoclonales", "XXI Congreso Centroamericano y del Caribe de Ciencias Farmacéuticas y III Congreso Nacional", San José, Costa Rica.
- Rampazzo P.** 1990. "Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry". I farmaco, 45 (supplement No. 6). 807-817.
- Rosales I.** 1992. "Validation of analytical methods". Short report of Biotechnology Habana '92 Congress. vol. 1 pp 23.6
- Rosales, I.; Izquierdo, M.; Acosta, A.; Costa, L.; Currás, T.; Quintana, M.; García, G.; Cruz, A.; Pérez, E.; Rodríguez, O.; Candelario, M.; Poutou, R.; López, J.L.; Rumbaut, T.; Torres, M.; Roig, R.; Lavadié, D.; Pérez, G.; Morera, V.; Falcón, V. y Reyes. J.** 1994 "Desarrollo de una metodología para la validación de las técnicas analíticas que intervienen en el control de calidad de productos Biotecnológicos y su aplicación práctica en la vacuna cubana anti-hepatitis B recombinante" IX Fórum de Ciencia y Técnica. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.
- Thomas Karnes H., Shiu Gerald and Shah Vinod P.** 1991. Review. "Validation of Bioanalytical Methods". Pharmaceutical Research. Vol. 8 N4, 421-426.