

ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS

Pers. Jur. Nº1.530.806

16 años de actividad
Tabla de contenidos

CARTA A LOS ASOCIADOS

ARTÍCULO

[Verificación de la Integridad del Filtro Utilizado en Aplicaciones
Líquidas. Parte 2 : Revisión](#)

M.W. Jornitz, J.P. Agalloco, J.E. Akers, R.E. Madsen, y T.H. Meltzer

ANUNCIOS

- * Curso Teórico - Práctico
- * Convocatoria a Asamblea General Ordinaria

SERVICIOS OFRECIDOS por A.B.A.C.

**Líneas Celulares Disponibles Control de Micoplasma Depósito
de Ampollas en Nitrógeno Líquido. Manual de ATCC**
(Traducción ABAC)

Estimado Socio/a:

A lo largo de estos dieciséis años nos hemos contactado con Ustedes, haciéndoles llegar artículos científicos y actualizaciones periódicas en temas de interés en nuestro campo, por medio de nuestro Boletín Trimestral. Éste fue creciendo en la medida de nuestras posibilidades. Hoy consideramos que tenemos que dar un nuevo paso y es por ello que decidimos hacerles llegar nuestro habitual Boletín trimestral a través de Internet. De esta manera podrán acceder a la información en forma más ágil y segura. Nuestro Boletín estará disponible para todo el público, por un tiempo limitado, en la dirección de nuestra **página web: www.abac.org**. Después podrán acceder al mismo únicamente los socios de ABAC registrados quienes poseerán una clave para su acceso. Es por ello que solicitamos su colaboración para poder llevar a cabo este proyecto: necesitaríamos que nos enviaran sus datos actualizados (donde figure su dirección de e-mail) a nuestra **casilla de e-mail (abac_informes@yahoo.com)**.

Aquellos socios que no posean acceso a Internet les pedimos por favor que se comuniquen con nosotros (por carta a nuestra dirección, Julián Álvarez 1218 Capital).

Por otra parte queremos poner en su conocimiento que este año estamos organizando un **curso teórico - práctico Garantía de Calidad en Cultivos Celulares**, que se llevará a cabo el día el día 9 de octubre del corriente en el aula de la Federación Bioquímica Argentina. Les adjuntamos en hoja a parte más información.

Desde ya agradecemos su colaboración y lo saludamos atentamente

COMISIÓN DIRECTIVA DE ABAC

ASAMBLEA ANUAL ORDINARIA

Se invita a todos los Señores Asociados a participar de la Asamblea Anual Ordinaria que se llevará a cabo el día 9 de octubre del corriente a las 17 hs. en el Aula de la Federación Bioquímica Argentina, Viamonte 1167 3º piso Buenos Aires.

Según el Orden del día, se tratarán los siguientes temas:

- 1 - Lectura de Memoria y Balance del ejercicio 2001-2002
- 2 - Consideración de aranceles
- 3 - Cambio de Comisión Directiva
- 4 - Elección de dos asociados para firmar el Acta

Verificación de la integridad del filtro utilizado en aplicaciones líquidas

Parte II

MW Jornitz, JP Agalloco, JE Akers, RE Madsen y TH Meltzer

NOTA: Este artículo ha sido transcrito por la ABAC desde la Edición Argentina de Pharmaceutical Technology, N° 55, 2002.

INTRODUCCIÓN

Los autores discuten sobre las influencias de las variables de la prueba, en particular sobre la falta de homogeneidad del filtro en la caracterización de la prueba de cartuchos de 10 in con discos de 47 mm, y sobre como el uso de márgenes de seguridad puede acomodar variaciones del 10% en los resultados de la prueba. Se subraya la necesidad de filtros de prueba mas largos y se evidencian las ventajas del uso de maquinas de prueba automáticas. Los autores también discuten sobre los filtros «esterilizadores» y la falta de precisión para identificarlos como tales, realizando solamente una prueba de integridad, proponen un mejor manejo de la carga biológica en lugar de realizar mas pruebas con preparaciones terminadas.

En la Parte I de este artículo, publicado en diciembre de 2001 en la edición N° 54 de Pharmaceutical Technology Argentina, se mostraron las diversas causas de las imprecisiones en las determinaciones del punto de burbuja (1).

Los autores afirmaron que la fijación del punto de burbuja mas exacto podría lograrse implementándolo a partir de información obtenida del flujo de aire difuso. Estas mediciones, junto con las determinaciones del punto de burbuja, permiten ubicar con mayor precisión el origen del flujo de aire en masa. Esto hace posible la identificación del filtro «esterilizador», y permite dilucidar la relación entre el valor de la prueba de integridad correspondiente a la humedad del agua y a la humedad del producto, para realizar el ejercicio de validación del filtro.

IMPRECISIONES DEL FLUJO DE AIRE DIFUSO

Mediciones multipunto del flujo de aire difuso

La curva del flujo de aire difuso, graficada según las lecturas en diversos puntos a medida que se aumentaba la presión, se representa con una línea recta con una pendiente en constante aumento hasta que se forma una curva y comienza a ascender en respuesta a las influencias anisotrópicas del poro (véase Figura 1). En algún lugar de la sección curva se encuentra el punto de burbuja. La curva se abre hasta formar una línea recta que representa el flujo de aire en masa.

La curva, desde su origen a partir de la línea recta hasta el punto de burbuja sobre el sector no lineal, describe el flujo de aire difuso total. Una curva como esta puede caracterizar en forma única cada uno de los diversos tipos de membrana microporosa. Una vez que se ha definido la curva del flujo de aire difuso para el tipo de filtro a través del análisis multipunto, se puede utilizar la prueba de difusión a través de un solo punto, en base a esta curva, para comprobar la integridad de los filtros individuales de este tipo. Si la lectura de la prueba simple para el filtro que se esta probando se encuentra dentro de la línea del arquetipo, el filtro testeado es integral. Si se encuentra sobre la línea, la lectura se interpreta como que la curva ascendente indica que la membrana tiene un valor bajo del punto de burbuja. Ese filtro no pasa la prueba de integridad. Si la lectura se encuentra por debajo de la línea aplicando la presión correspondiente a la prueba, se advertirá que la membrana es mas gruesa o que tiene una porosidad total menor.

Si no se ha establecido la curva maestra para el tipo de filtro a través de la prueba multipunto, sólo existe una correlación empírica para juzgar la integridad del filtro a partir de una lectura de difusión de un solo punto. En el caso del punto de burbuja, se ha demostrado que existe una correlación sustentada por la teoría, entre sus valores y las retenciones de organismos. Los puntos de burbuja reflejan los poros mas grandes de los filtros, y por ello, están relacionados con las retenciones. Una relación causal, como la que existe entre el punto de burbuja y la retención, se requiere para aceptar que existe una correlación entre eventos, que pueden de otra forma considerarse paralelos pero independientes. De acuerdo con la ley de difusión de Fick, los flujos de aire difusos son consecuencias de la porosidad total de un filtro; el tamaño del poro per se no es una influencia (véase Figura 2). Por ello, no existe una conexión lógica inmediatamente aparente entre los valores correspondientes al flujo de aire difuso y las retenciones de partículas (2). Sin embargo, aunque sean relativamente pocos en número, los poros mas grandes permiten flujos de aire mayores siendo el flujo proporcional al cuarto poder del radio del poro o al cuadrado del diámetro, de acuerdo con la relación de Hagen Poiseuille (3, 4). En cualquier caso, si se extiende la medición del flujo de aire difuso hasta la presión del punto de burbuja, se obtiene una lectura mas confiable del punto de transición entre ambos flujos de aire.

El grado de inexactitud depende de la ubicación precisa del punto de burbuja, tanto en su propia medición como en su determinación a través de las investigaciones del flujo de aire difuso. Sin embargo, si se utilizan ambos métodos se reduce el área de incertidumbre y se obtiene una mayor confiabilidad. Esto se logra realizando las mediciones multipunto del flujo de aire difuso .

Mediciones de un solo punto del flujo de aire difuso

La FDA acepta las pruebas de flujo de aire difuso de un solo punto y se supone que es un método apropiado para verificar la integridad de un filtro. Algunos sostienen que debe existir una correlación entre este y la retención de organismos, aunque la correlación puede no ser aparente: «Un filtro que ha pasado la prueba bacterial, pasara la prueba de flujo de aire difuso, y un filtro que no ha pasado la prueba bacterial, no pasara la prueba de integridad de flujo de aire difuso» (5). Por lo general, la prueba de integridad de un solo punto se realiza con el 80% de la presión del punto de burbuja.

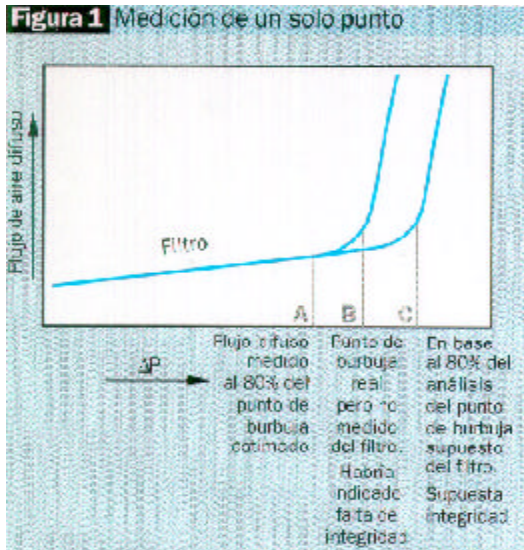
La determinación se realiza a lo largo de la porción recta de la línea de flujo de aire difuso, evitando las dificultades que implican medir la porción de la curva (6).

La prueba de un solo punto a 80% se basa en la suposición de que si la prueba se realizara en presiones de multipunto, el grafico de flujo de aire difuso para ese filtro en particular, se extendería hasta el nivel del punto de burbuja característico de los filtros integrales de su tipo (expresado como una proposición hipotética en la lógica formal, el silogismo seria: «Si el filtro es integral, pasara a 80%. Es integral. Por lo tanto, pasa a 80%». Sin embargo, afirmando la consecuencia de que pasa a 80% no se llega a un conclusión valida, es decir, que el filtro es integral. Este razonamiento comete una falacia al afirmar la consecuencia. La medición de flujos difusos al 80% de la presión del punto de burbuja no puede demostrar la performance mas allá de ese punto (véase Figura 1).

No obstante, la prueba de integridad de un solo punto ha tenido un pasado exitoso. Se encuentra dentro de la lista de la USP y esta aceptada por la FDA y otras entidades regulatorias. Son muchos los usuarios de filtros que confían en ella, particularmente en Europa. Sin embargo, están asociados la suposición y los riesgos inevitablemente asociados con la suposición - lo cual constituye un riesgo innecesario porque la situación puede volverse confiable realizando pruebas multipunto sin basarse en ninguna suposición.

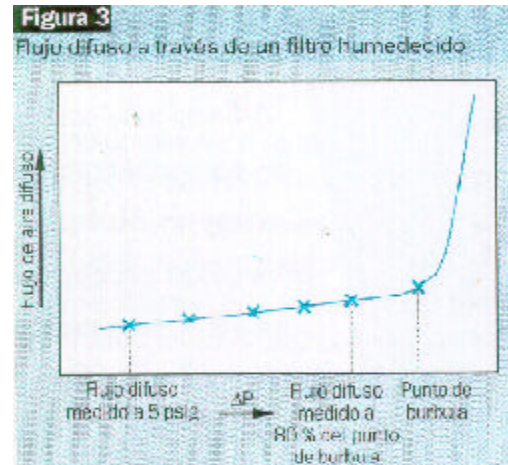
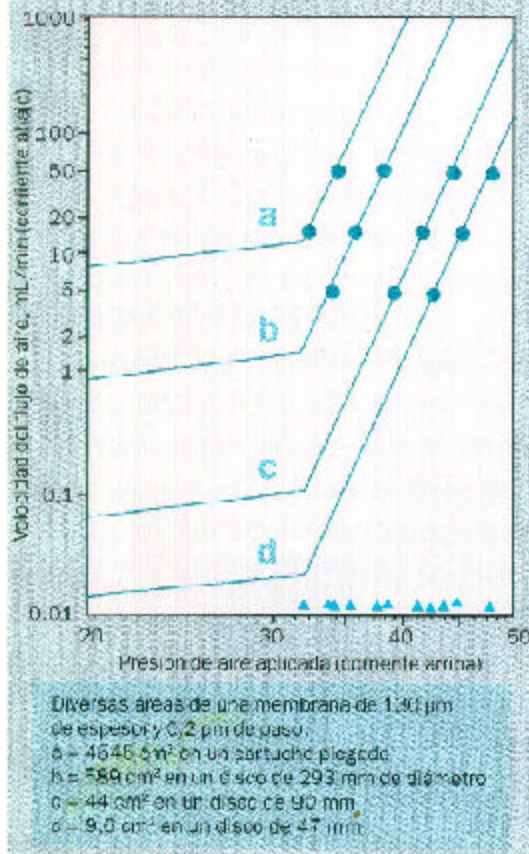
Es interesante destacar que cuando se introdujo la prueba de integridad de un solo punto (flujo hacia delante), se aplicaba una presión de 5 psi.

Se supuso que existía una correlación entre la difusión de aire máxima de 5 psi de la prueba de integridad y las retenciones de organismos. Sin embargo, en la Figura 3, observamos que esto sólo ocurre porque la presión aplicada durante la prueba del filtro se encontraba por debajo del punto donde se evidencia la falta de integridad, en el caso de que la hubiera. Si la prueba se realiza con 5psi, no se descubre nada acerca del filtro cuando se aplican presiones por encima o por debajo de ese nivel. Las fallas de integridad pueden manifestarse cuando se aplica una presión de 5 psi hasta la presión del punto de burbuja, sin ser detectadas (6). Por lo tanto, el protocolo para la prueba de un solo punto se modificó hasta alcanzar el 80% de la presión del punto de burbuja, acercándose lo mas posible a la iniciación de la curva al abandonar la linealidad.



La fabricación de las membranas microporosas se realiza de acuerdo con estándares de alta calidad, por lo tanto es difícil que un producto presente imperfecciones. Esto explicaría que los filtros pasaran la prueba al 80%, demostrando su integridad. El hecho de que la prueba de integri-

Figura 2 Desplazamiento aparente del punto de burbuja en función del diámetro del filtro (13)

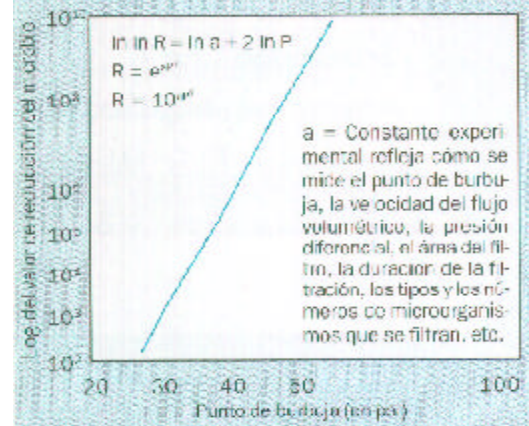


dad ofrezca evidencia de que la elaboración del filtro es confiable, es alentador; pero el propósito de la prueba de integridad es evaluar individual y específicamente el filtro que se está utilizando. La integridad de los otros filtros es irrelevante (2). Para alcanzar este objetivo es preferible realizar la prueba multipunto.

En ciertos casos, la prueba de un solo punto puede suministrar la respuesta a todas las preguntas. Si la lectura de un solo punto al alcanzar un nivel del 80%, cae por encima de la línea recta característica de los filtros integrales de su tipo, indicando una velocidad de difusión superior a la máxima, el punto de burbuja de dicho filtro es demasiado bajo, y el filtro no ha pasado la prueba de integridad.

Prueba por encima del punto de burbuja indicado por el fabricante
 La prueba para comprobar el paso de aire a través de un filtro humedecido aplicando presiones por encima del punto de burbuja mínimo indicado

Figura 4 Curva general que relaciona la retención de microbios con el punto de burbuja (12).



por el fabricante, puede producir un flujo de aire en masa. No obstante, dependiendo de cuanto exceda el mínimo del punto de burbuja de un filtro en particular dentro de su tipo, puede resultar un flujo de aire difuso, no en masa. Esta situación podría confirmar la integridad del filtro. Por lo general, los fabricantes de filtros proveen, como un agregado del margen de seguridad, membranas que tienen puntos de burbuja por encima de los niveles mínimos que se utilizan para lograr las retenciones de los organismos requeridos. En estos casos, es válida la prueba de flujo de aire difuso de un solo punto (flujo hacia adelante) para comprobar la integridad del filtro.

Una simple prueba de integridad utilizando un equipo automático para realizarla, puede llevar unos 20 minutos. Si fuera necesario realizar varias pruebas, será considerablemente largo el tiempo necesario para practicarlas. La ventaja de realizar una prueba de difusión de un solo punto, cuando puede aplicarse responsablemente, es que permite ahorrar tiempo y esfuerzo.

COMBINACIÓN DEL FLUJO DIFUSO CON EL PUNTO DE BURBUJA

La importancia singular del punto de burbuja es que señala los poros mas grandes. Esta es la razón de su correlación con las retenciones de organismos. Lamentablemente, su determinación exacta se ve comprometida por las interferencias mencionadas en la Parte I de este artículo. Por ejemplo, es imposible separar el componente del flujo de aire difuso del flujo de aire en masa. Los flujos de aire difuso medidos en un solo punto, el producto de la porosidad total, carecen de la relación casual específica entre el punto de burbuja y su relación con los poros mas grandes. Por el contrario, los análisis de flujo de aire difuso multipunto ofrecen la oportunidad de establecer una correlación con las retenciones de organismos.

Comenzando desde el origen, el grafico que representa los flujos de aire difuso con las presiones que aumentan progresivamente, se analizó hasta alcanzar un nivel del 80%, formando una línea recta. En algún lugar, por encima de este punto, comienza a perder su linealidad. Por eso, disminuye la confiabilidad y sus implicaciones en la retención se vuelven inciertas. El punto de burbuja tiene su propia incertidumbre. Sin embargo, si se extiende la prueba de flujo de aire difuso hasta incluir su medición la presión del punto de burbuja, se restringe el área de incertidumbre, limitando y reduciendo el riesgo que implica. De esta forma se torna mas cierta la relación entre el punto de burbuja y las retenciones de organismos, lo cual constituye el objetivo a lograr.

La prueba multipunto de este tipo es adecuada para las diversas etapas de prefiltración inicial, dentro de las pruebas de integridad. No obstante, no se pueden hacer comparaciones con la membrana posfiltración, donde se han formado depósitos de partículas de cierto tamaño en el filtro. Una vez que el filtro ha sido cargado y se ha alterado su porosidad total, se ha transformado en un filtro «nuevo», con una estructura diferente de los poros (es decir, porosidad total, distribución de poros según el tamaño y tamaño de los poros mas grandes). Como resultado de esto, también cambiaron las características de la difusión. Por esta razón, es necesario trazar su propio grafico multipunto para realizar una comparación con la membrana de prefiltración (7).

La información confiable que surge de una prueba multipunto, evitando las suposiciones, puede obtenerse a partir de sólo dos puntos de la prueba, en lugar de la lectura de un solo punto. Es suficiente medir el paso de aire a 80% del punto de burbuja, o cualquier otro punto intermedio que se elija, y el punto de burbuja. Schroeder indica que el uso de punto de origen (cero) también nos permite trazar una línea recta sobre la base de tres puntos (8). La línea graficada desde el punto de origen, pasando por el punto intermedio hasta llegar al punto de burbuja podría confirmar la integridad del filtro. Sin embargo, como el flujo de aire difuso no puede separarse del flujo de aire en masa, aun permanece la incertidumbre en cuanto a las lecturas del punto de burbuja. Schroeder sugiere que la curva de linealidad del flujo de aire difuso debe verificarse «preferentemente aun mas allá del punto de burbuja para tener un margen de seguridad adicional y compensar imprecisiones potenciales en la medición de la presión de la prueba y el flujo húmedo».

Las ventajas aumentan en cuanto a la definición que se logra con el multipunto de la línea de flujo de aire difuso, particularmente su pendiente. La pendiente de la línea puede compararse con aquellas otras curvas. Las diferencias entre pendientes pueden tener significados relevantes. Esto nos permite transformar las comparaciones de varias líneas de flujo de aire difuso en una herramienta para el diagnóstico que resulta útil para comprobar las diferencias entre varias membranas.

En particular, en el esfuerzo de validación, es esencial que resulte válida la proporción entre agua y producto que determina la aplicación del valor mínimo de la prueba de integridad de humedad del agua al valor mínimo de humedad del producto (9). Debe compararse en su totalidad la línea del flujo de aire difuso humedecido con agua con la curva del producto humedecido. Las dos

líneas deben ser completamente congruentes. Los valores de un solo punto simplemente no serán suficientes.

Ni la prueba del punto de burbuja ni la determinación simple del flujo de aire difuso en sí mismas, cumplen con el propósito de la prueba de integridad como lo hacen los análisis multipunto. Sin embargo, una vez que se obtiene la línea de flujo de aire del producto. La prueba de flujo de aire difuso de un solo punto, puede aceptarse en el contexto del procesamiento. La posibilidad, en dichos casos, de que se produzca una negligencia entre el punto de prueba del 80% y el punto de burbuja se considera aceptablemente reducida debido a la caracterización completa del tipo de filtro. Se pueden hacer diversas interpretaciones de acuerdo con la lectura que se realice de un solo punto, según se encuentre igual, por encima o por debajo de la línea de flujo de aire difuso característica del tipo de filtro.

EQUIPOS AUTOMÁTICOS PARA REALIZAR LA PRUEBA DE INTEGRIDAD

Las máquinas automáticas para realizar las pruebas ofrecen algunas ventajas para la práctica de la prueba de integridad. La subjetividad y el error humano en la reunión y el registro de datos, sumado a la ambigüedad de la información resultante, quedan eliminados. Esta es una consideración muy importante. Además, a diferencia del procedimiento común de la prueba manual, la recolección de la información que surge de la prueba la realiza, por lo menos la mayoría de los equipos, en el mismo sentido en el que pasa el producto a través del filtro. De esta forma se elimina el riesgo de asepsia al atravesar la barrera del filtro. Muchos equipos automáticos proveen una copia impresa que puede utilizarse como registro del lote o como herramienta de investigación. Algunos instrumentos incluyen tarjetas de memoria para almacenar datos o permitir el registro electrónico del lote a través de conexiones directas con la base de datos del proceso. Los equipos de prueba automáticos también pueden utilizarse para determinar la integridad de los filtros hidrófobos realizando la prueba de intrusión de agua (este tema que no se trata en este artículo).

Las mediciones en sentido ascendente se logran a través del uso de instrumentos, que contienen datos que se ajustan a la ley del gas ideal (o perfecto) para permitir la resolución de los cálculos necesarios. (La ley del gas ideal puede expresarse de la siguiente manera $PV = nRT$, donde P es la presión, V es el volumen, n representa el número de moles de gas, R es la constante del gas universal igual a 1,99 L atm/K mol, y T es la temperatu-

ra en grados Kelvin. La temperatura es una variable para cada una de las pruebas de integridad. Es importante que la temperatura se mantenga constante durante la práctica de cada prueba en particular).

El uso de medidores de flujo de masa o transductores de presión es importante para alcanzar los volúmenes de gas; otro método es utilizar cilindros con volúmenes definidos en forma exacta. La relación inversa entre volumen y presión en la ley de gas ideal permite realizar el cálculo de uno a través del conocimiento del otro. Los datos sobre el descenso de la presión son traducidos por medio de algoritmos, fórmulas que interrelacionan los diversos factores operativos con datos del flujo de aire difuso, para los cuales existen correlaciones con las retenciones de organismos.

Cada uno de los distintos tipos de pruebas automáticas para verificar la integridad puede tener su propio punto de transición estándar. Cada uno puede establecer el punto de burbuja en una forma diferente. No obstante, las diferencias entre los ajustes no afectan significativamente el intercambio de los instrumentos ni la utilidad de sus mediciones.

VARIACIONES EN LOS PUNTOS DE BURBUJA

Sundaram y otros llevaron a cabo una investigación exhaustiva sobre el efecto de la metodología de la prueba sobre los análisis del punto de burbuja, utilizando dos protocolos manuales y cuatro protocolos automatizados, incluyendo distintos tipos de filtros en forma de disco (47 mm de diámetro) y en forma de cartuchos de 10 in (10). Todas las pruebas fueron realizadas por cada uno de los dos operarios. Llegaron a la conclusión de que la expresión punto de burbuja «se refiere a una colección de diversos métodos de prueba» definidos obviamente por diferentes procedimientos, medidos de distintas formas y con distintos puntos finales. Las diferencias entre los resultados obtenidos pueden explicarse ampliamente en base a las influencias familiares como el área del filtro, la sensibilidad de la medición, la subjetividad y la falta de homogeneidad del filtro. El último factor mencionado puede tener un efecto significativo sobre la aplicación de los valores de la prueba de integridad de los filtros de discos pequeños a los cartuchos de membranas.

Las mediciones mostraron variaciones de 5 y 6 psi, «dependiendo del tipo exacto de prueba utilizado». La variación en los resultados abarcó tanto las pruebas automáticas como las manuales. El punto es que la precisión no cuestionada no ca-

racteriza ni siquiera la prueba de punto de burbuja mas sofisticada. Su variación tradicional de ~10% es aceptable. Esta variación promedio es valida tanto para los discos de 47 mm como para los cartuchos de 10 in (11).

La variación ~10 % entre mediciones no desmerece la utilidad de las pruebas de integridad en cuanto a la identificación de los filtros, ni su rol como indicadores de las diferencias entre las situaciones de pre y post filtración. En el estado actual de su nivel de precisión, las pruebas de integridad pueden establecer una diferencia entre los distintos ratings para la identificación del tamaño de los poros. También son capaces de descubrir daños importantes en el filtro, indicar incompatibilidades sutiles entre la membrana y el líquido y afirmar el ensamble integral del proceso de filtración.

APLICACION DE LOS VALORES DE LA PRUEBA DE INTEGRIDAD

Sundaram y otros concluyen en sus estudios que «no existe una correlación directa entre los valores del punto de burbuja del disco y del punto de burbuja del cartucho, aun cuando se utilice el mismo tipo de prueba para calcular ambas determinaciones». El valor del punto de burbuja asignado a un disco de 47 mm utilizado en una validación bacteriana no corresponde al valor de la especificación de un cartucho para filtración, aun cuando se utilice un instrumento automático para determinarlo» (11). Por ello, es muy importante la aplicación de los valores obtenidos para un disco humedecido con agua a los valores correspondientes a los cartuchos, y que a su vez corresponden a los valores obtenidos de los filtros humedecidos con el producto. Esta aplicación es un requisito clave para el ejercicio de validación del filtro, porque la retención de organismos se determina utilizando filtros de 47 mm, mientras que el procesamiento se realiza con cartuchos con membranas.

Sundaram y otros descubrieron, como lo hicieron Johnston y otros dos décadas atrás (12), que los números obtenidos de los discos de 47 mm siempre son mas elevados que los obtenidos de los cartuchos. Por ello, si por error se asignaran los valores de la prueba de integridad del disco de 47 mm a los cartuchos, la definición de la identidad del filtro de producción humedecido con agua, será por lo menos mas estricta. Lo cual, sin intención alguna, se traduce en un acto de prudencia.

Seria muy valioso que los fabricantes de filtros realizaran estudios similares a los llevados a cabo por Sundaram y sus colegas, ya que se concentran en la falta de homogeneidad de las unidades

de varias membranas microporosas. Los resultados ayudarían a definir el área de filtro mas pequeña adecuada para determinado tipo de membrana, necesaria para realizar los estudios de validación para la retención de organismos. Anteriormente destacamos que los fabricantes de filtros están perfeccionando las propiedades para la retención de organismos de sus filtros, utilizando áreas mas extensas de membrana que los discos comunes de 47 mm

DEFINICION DE FILTRO

«ESTERILIZADOR»

La definición del valor (mínimo) correspondiente a la prueba de integridad que indica que un filtro es «esterilizador», es la que lo caracteriza por su capacidad para retener organismos de 1×10^7 cfu de *Brevundimonas diminuta* por centímetro cuadrado del área de filtración efectiva, es demasiado conocida para requerir elaboración. (Revisión sobre este tema pueden hallarse en referencias 15 y 16). Antiguamente, la importancia de las pruebas de integridad era que sus valores se utilizaban para identificar este tipo de filtros.

Existen ciertas incertidumbres en la definición del punto de burbuja preciso indicativo para la retención formal de 1×10^7 cfu/cm² de *B. diminuta*, pero esto no es ninguna novedad. Johnston y otros hallaron que el grafico de la retención de organismos y el punto de burbuja mostró una pendiente de dos (véase Figura 4) (13). Una discrepancia del 10 % en las lecturas del punto de burbuja indicaría una diferencia entre las retenciones de 1×10^7 y 1×10^5 . Los fabricantes de filtros tratan de evitar esta situación colocando membranas con puntos de burbuja que exceden el valor mínimo «esterilizador». El precio que paga el usuario del filtro es una cierta disminución en la velocidad del flujo y, en el caso de líquidos con cargas mas pesadas, un rendimiento posiblemente abreviado.

Sin embargo, la identificación del filtro «esterilizador» con el valor de la prueba de integridad enfatizó la necesidad de realizar mediciones mas precisas. La singularidad del valor adecuado de la prueba de integridad definía el filtro «esterilizador». Consecuentemente, el aseguramiento positivo de que el filtro que se utilizaba era suficiente para validar el proceso de filtración. Se ha reconocido que esta practica es una sobre simplificación, particularmente porque el mecanismo para la retención de organismos dependía exclusivamente de la exclusión por tamaño a partir de la acción de tamizar.

Para enfatizar, la obtención de una filtración estéril es actualmente un proceso mas complejo. De-

pende de la interacción de varios factores, por ejemplo: la relación entre el poro y el organismo, su posible modificación por contacto con los organismos y el filtro con el líquido del medio; el efecto de las propiedades del líquido sobre la doble capa eléctrica y las consecuencias de las adsorciones y la influencia de las condiciones en las que se realiza la filtración, especialmente las influencias hidráulicas que gobiernan las capturas de organismos por adsorción. En estas circunstancias, el rol de la prueba de integridad pierde su antigua preeminencia. Ya no goza de la confiabilidad para las retenciones de organismos que una vez tuvo.

La situación es que los valores que arrojan las pruebas de integridad, aunque son importantes, no tienen la importancia que una vez tuvieron en esta aplicación. De la misma manera, la exactitud de sus lecturas puede acarrear una desviación. No es necesario exagerar los esfuerzos por optimizarlas.

Actualmente, un riesgo en la validación de un filtro podría ser el confiar ciegamente en los valores que arroja la prueba de integridad. Anteriormente, el error en el valor de una prueba podía ocasionar el desperdicio de un filtro y el descarte de un lote completo de producción. Es evidente que el filtro es considerado un elemento vital dentro de un proceso de control microbiano holístico en vez de ser el único garante de «esterilidad». Las validaciones deben confirmarse con análisis microbiológicos que llevan a realizar estudios de carga biológica(14, 15).

El uso indebido de un filtro que no cumple las especificaciones de performance aun puede ocasionar el desperdicio del filtro y de la operación de filtración. Sin embargo, los requisitos para el control del proceso que garantizan una carga biológica bien controlada, pueden proporcionar un nivel de seguridad que no puede alcanzarse solamente a través de un sistema de filtración. Esta seguridad agregada es vital dada la relación incierta entre tamaño del poro, prueba de integridad y retención.

CONCLUSION

Una vez que se ubican satisfactoriamente los procedimientos para realizar las pruebas de integridad, se pueden conocer los ratings de porosidad. Son capaces de indicar el daño del filtro, y revelan aun incompatibilidades sutiles entre el filtro y el fluido. Además, suministran información acerca de la integridad del proceso de filtración. No obstante, existen cambios asociados con el rol de la prueba de integridad en las validaciones de los filtros, y se reconocen mejor los límites de la homogeneidad de la membrana.

Los valores exactos obtenidos de las pruebas de integridad que determinan que un disco de 47 mm puede definirse como un filtro «esterilizador» (debido a que puede retener adecuadamente a *B. diminuta*), no pueden aplicarse a los filtros de cartucho. Este hecho ha promovido esfuerzos para designar con gran exactitud el punto de referencia preciso de modo que la aplicación pueda hacerse correctamente.

También es sabido que los valores exactos de las pruebas de integridad pueden verse afectados por interferencias que surgen de los efectos del área del filtro, de las limitaciones en la toma de mediciones y de otras influencias. Esto también ha llevado a realizar esfuerzos, tal vez exagerados, para definir exactamente los puntos de la transición.

Sin embargo, parecen innecesarios los esfuerzos épicos en este sentido. Los fabricantes de filtros producen membranas microporosas con márgenes de seguridad dentro de los valores de las pruebas de integridad. Estos deben exceder los puntos de burbuja mínimos y/o los flujos de aire difuso máximos para evitar problemas. De hecho, esto puede crear problemas al final de la producción donde se buscan filtros del proceso con valores cercanos al mínimo o al máximo, según el caso, para no pagar innecesariamente por los márgenes de seguridad en términos de los flujos del proceso restringido.

Además, los valores arrojados por las pruebas de integridad ya no certifican la validación. La obtención de una filtración estéril no depende tanto del valor que arroje cualquier prueba de integridad que necesita alcanzar su nivel numérico con exquisita precisión. La industria encuentra difícil la aceptación de este desenlace; el concepto anterior acerca de la certeza de la validación a través de las pruebas de integridad era todo una garantía, y tanto mas complicada es la interpretación actual, particularmente porque no se logran interpretar las influencias que se han descubierto recientemente. No obstante, la realidad prevalece.

De hecho, la industria farmacéutica debe reconsiderar completamente el concepto de filtro «esterilizador». En la actualidad, no se conoce ningún filtro esterilizador universal capaz de retener todos los organismos en todas las circunstancias. Este filtro ofrecería la absoluta confianza de que el mecanismo de filtración retendría todas las partículas, y evitaría la ocurrencia de adsorciones imprevisibles. No es necesario que el filtro esterilizador sea capaz de retener todos los organismos, conocidos o desconocidos, en cualquier condición, y de cualquier y todos los medios.

Una definición realista de filtro «esterilizador» es la que dice que en virtud de las condiciones de filtración dadas, retiene todos los organismos conocidos o que pudieran estar presentes, o por lo menos aquellos que se consideren importantes desde el punto de vista de la seguridad del usuario. Los filtros pueden arrojar efluentes estériles a pesar del rating del tamaño de sus poros, siempre que las condiciones de la filtración sean adecuadas. Por ello, las pruebas de integridad, indicativas del tamaño de los poros, carecen en esta aplicación de la autoridad máxima que ostentaban anteriormente.

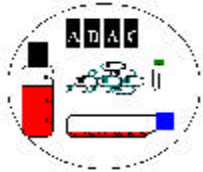
Desafortunadamente, la esterilización deberá definirse y detallarse en base a cada caso, considerando específicamente el tipo de organismo, el tipo de filtro, la constitución del vehículo líquido y las condiciones de filtración. Sobre todo, la esterilidad deberá definirse en términos de los organismos que se pretende retener. Para ello, es

necesario realizar estudios de carga biológica. También puede ser necesario un conocimiento científicamente preciso de los términos estéril y aséptico y una aceptación del hecho de que algunas incertidumbres son inherentes al control microbial en base a la retención, en el estado actual de la tecnología.

Hasta tanto la capacidad tecnológica determine lo contrario, la confianza debe depositarse en el sistema actual, utilizando generalmente B. diminuta como organismo de prueba, y la membrana de 0,2/0,22 mm como filtro «esterilizador», tal como esta expresado en el Informe Técnico de la PDA Nro. 26 «Filtración Estéril de los Líquidos» (9). La situación actual no requiere mas pruebas de productos terminados, sino un manejo mas adecuado de la carga biológica desde su mismo origen.

Referencias

1. M.W. Jorntiz, J.P. Agaloco, I.E. Akers, R.E. Madsen, and T.H. Meltzer, «Filter Integrity Testing in Liquid Applications, Revisited: Part 1,» Pharm. Technol. 25 (10), 34-50 (2001) and Pharmaceutical Technology Argentina N° 54 (2001).
2. T.H. Meltzer, «The Insufficiency of Single-Point Diffusive-Airflow Integnty Testing,» J Parenteral Sci. Technol. 46 (1), 19-24 (1992).
3. PR. Johnston, Fluid Sterilization by Filtration (Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, 1st ed., 1992), pp. 90-110.
4. T.H. Meltzer, Filtration in the Pharmaceutical Industry (Marcel Dekker, New York, NY, 1987).
5. H. Haughney, «Letters to the Editor,» J Parenteral Sci. Technol. 46 (5), 142-143 (1992).
6. A.R. Reti, «An Assessment of Test Criteria in Evaluating the Performance and Integrity of Sterilizing Filters,» Bull. Parenteral Drug Assoc. 31 (4), 187-194 (1977).
7. TH. Meltzer, M.W. Jorntiz, and M.W. Mittelman, «Surrogate Attributes and Use Conditions: Effects on Bacterial Cell Size and Surface Charge Relevant to Filter Validation Studies,» presented at PDA Second Asian Symposium, Osaka, Japan, 17-19 February 1997.
8. H.G. Schroeder, «Rationalization and Valid ScaleUp of Integnty Test Parameters for Sterilizing-Grade Filter Cantridges,» PDA J Pharm. Sci. and Technol. 55 (2), 134-142 (2001).
9. Parenteral Drug Association, Technical Repon No. 26, «Sterilizing Filtration of Liquids,» PDA J. Pharm. Ssi. Techinol. 52 (3), supplement. 1-31 (1998).
10. S. Sundaram et al., «Bubble-Point' Type Tests as Filter Integrity Tests, Part I» Pharm. lechnol. 24 (9). 90-115 (2000)
11. S. Sundaram et al, «Considerations in Using 'Bubble Point' Type Tests as Filter Integrity Tests, Pan 11,» Pharm. Teshzol. 24 (10), 108-137 (2000).
12. PR. Johnston and T.H. Meltzer, «Comments on Organism Challenge Levels in Sterilizing Filter Efficiency Testing,» Pharm. Technol. 3 (11), 66-70, 110 (1979).
13. PR. Johnston, R.C. Lukaszewicz, and T.H. Meltzer, ' Certain Imprecisions in the Bubble-Point Measurement». Parenteral Sci. Technol. 35 (1), 36-39 (1981).
14. K. Kawamura, M.W. Jomitz, and TH. Meluer, «Absolute or Sterilizing Grade Filtration - What is Required?» PDA J Pharm. Sci. Technol. 54 (6), 485-492 (2000).
15. M.W. Jorntiz and T.H. Meltzer, Sterile Filtration -A Practital Approach (Marcel Dekker, New York, NY, 2001).
16. J.R. Carter and R.V. Levey, «Validation of Sterilizing Filtration» in Filtration in the Biopharmaceutical Industry T.H. Meltzer and M.W. Jomitz, Eds. (Marcel Dekker, New York, NY, 1998), Chapter 18.



**Asociación
Banco Argentino
de Células**

Curso Teórico - Práctico

Garantía de Calidad en Cultivos Celulares

Módulo I

PROGRAMA DE ACTIVIDADES

Mañana

08.30 a 09.00 hs.: *Inscripción*

09.15 a 10.00 hs.: *Elementos fundamentales de buena práctica de laboratorio*

10.15 a 11.00 hs.: *Agua*

Pausa

11.15 a 12.00 hs.: *materias primas e insumos no biológicos*

12.15 a 13.00 hs.: *materias primas e insumos proteicos*

Lunch (libre; no incluido). 13.30 a 14.15 hs.

Tarde

14.30 a 16.30 hs.: *Taller con aplicaciones prácticas sobre los temas tratados*

16.45 a 17.00 hs. *Asamblea Anual Ordinaria*

Fecha: 9 de octubre de 8.30 a 17.30 hs.

Aranceles: a determinar

Lugar: Aula de la Federación Bioquímica Argentina
Viamonte 1167 3º piso Buenos Aires, Argentina

ABAC

Julián Alvarez 1218 (C1414DRZ)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires
abac_informes@yahoo.com.ar

SERVICIOS OFRECIDOS POR ABAC

1- líneas celulares

La ABAC ofrece cada una de las líneas especificadas seguidamente en forma de ampollas con células congeladas o en botella descartable T 75 (superficie de trabajo de 75 cm²).

Líneas disponibles en INEVH

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
BHK-21	Riñón de hamster dorado	Hamster	Monocapa de fibroblastos	ATCC
CHO-K1	Ovario de hamster chino	Hamster chino	Monocapa epitelial	ATCC
MRC-5	Pulmón fetal humano (diploide)	Hombre	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Wish	Amnion humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Hep-2	Carcinoma humano (órgano)	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Vero C-76	Riñón de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Vero E-6	Riñón de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
L-929	Tejido conectivo de ratón	Ratón	Monocapa epitelial	ATCC
MDBK	Riñón bovino	Vaca	Monocapa epitelial	ATCC
RK13	Riñón de conejo	Conejo	Monocapa epitelial	ATCC
CRFK	Riñón de gato	Gato	Monocapa de fibroblastos	ATCC
HeLa	Carcinoma de cervix humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
RAJI	Linfoma de Burkitt humano	Hombre	Linfoblastos en suspensión	ATCC
IIBMel J	Melanoma humano	Hombre		ARGENTINA
T24	Carcinoma de vejiga humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
E. Derm	Dermis de caballo	Caballo	Monocapa de fibroblastos	ATCC
3T3 L1	Embrión de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Mc'Coy	Células de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Sarcoma 180	Sarcoma de ratón Swiss Webster	Ratón		ATCC
BT	Células de cornete nasal bovino (Bovine Turbinate)	Vaca		ATCC
EBTr	Traquea de embrión bovino	Vaca	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Clone C6/36	Larva de mosquito Aedes albopictus	Mosquito		ATCC
A-72	Tumor canino	Perro		ATCC
A-549	Carcinoma de pulmón	Hombre		ATCC
+ 3T3	Embrión de ratón	Ratón	Monocapa de fibroblastos	
SK-MEL-28	Melanoma maligno humano	Hombre		ATCC
CV-1	Fibroblastos de riñón	Mono		ATCC

Líneas disponibles en INTA:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
PK-15	Riñón porcino	Cerdo	Monocapa epitelial	ATCC
MDCK	Riñón canino	Perro	Monocapa epitelial	ATCC

Líneas aún no disponibles, que serán incorporadas para su distribución en un futuro próximo:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
C32TG	Melanoma amelanótico humano	Hombre		ATCC
P3HR1	Linfoblastos humanos derivados de Linfoma de Burkitt	Hombre		ATCC
Mosquito	Larva Aedes albopictus	Mosquito	Monocapa epitelial	ATCC
D-17	Sarcoma osteogénico de perro	Perro	Monocapa epitelial	ATCC
Y-1	Epitelio tumor adrenal	Ratón		ATCC
SF9	Ovario	Spodoptera frugiperda		ATCC
SL-29	Embrión	Pollo		ATCC
MDOK	Riñón	Ovino		ATCC

Aranceles:

No socios de ABAC: U\$s 90 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Los pagos se efectuarán contra entrega cuando las líneas celulares se retiren personalmente del lugar de distribución. En caso de ser requerido el envío postal, el material será despachado aproximadamente 72 horas luego de recibida la suma total. Esta será abonada por cheque o giro postal extendido a nombre de **Asociación Banco Argentino de Células**.

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INEVH dirigirse a:

Dra. Ana María Ambrosio
Instituto Nacional de
Enfermedades Virales Humanas (INEVH)
Monteagudo 2510
2700 Pergamino (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: anaambrosio@hotmail.com - Dra. Ambrosio
Tel.: (02477) 4 29712 /4 29713/ 4 29714
Fax.: (02477) 4 33045

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INTA dirigirse a:

Dr. Osvaldo Zabal
INTA Castelar
C.C. 77
1708 Morón (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: ozabal@cicv.inta.gov.ar - Dr. Osvaldo Zabal
Tel.: 4 621-1447/1278 int. 121
Fax: 4 621-1743

2- Control de micoplasmas en muestras de células*

El control de micoplasmas se realiza en muestras de células mediante la técnica de Chen, que consiste en la tinción del ADN con bis Benzimida (Hoechst 33258).

Aranceles:

No socios de la ABAC: U\$s 30 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Para coordinar el envío de muestras los interesados deberán contactarse con la Dra. Ambrosio por carta, telefónicamente o por Fax o e-mail.

*Chen TR In situ demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain.

Exp. Cell Res. 104: 255-262, 1977

3-DEPOSITO DE AMPOLLAS EN NITROGENO LIQUIDO:

Se recuerda que se encuentra a disposición de la comunidad científica la posibilidad de conservar réplicas de sus ampollas en tanques de nitrógeno líquido, asegurando así el resguardo de líneas valiosas. **El depósito de ampollas con células congeladas en nitrógeno líquido** tiene un **arancel anual de U\$s 50 por caña**, conteniendo 6 ampollas, siendo responsabilidad de la ABAC la custodia de los materiales en depósito y el mantenimiento del frío. Este servicio no involucra ningún tipo de control de calidad ni manipulación alguna de las líneas celulares en depósito.

Cada estudio sobre el material depositado se realizará a requerimiento específico del interesado, contra el pago de un arancel adicional. Los Socios de ABAC gozan de 1/3 de descuento de la cuota societaria sobre estos aranceles.

4- MANUAL DE ATCC:

La Comisión Directiva de la ABAC desea poner en conocimiento de sus asociados y a los usuarios de células cultivadas en general, que se encuentra dis-

ponible la versión en español de la publicación del American Type Culture Collection (ATCC):

ATCC - Métodos de Control de Calidad para Líneas Celulares - Edición 1992. Traducción ABAC

El costo de cada ejemplar es de treinta dólares (U\$ 30, o su equivalente en pesos) más los gastos de envío. Las órdenes de compra deberán remitirse a los destinos detallados en referencia a los servicios de la ABAC.

Informes y Venta

abac_informes@yahoo.com.ar

Se recuerda a los Sres. Socios de ABAC que para poder acceder al beneficio de **descuentos en servicios o adquisición** de células, **DEBERÁN TENER LA CUOTA AL DIA, AL 31 DE JULIO DE CADA AÑO (fecha de cierre del ejercicio económico).**

Desde ya, agradecemos su colaboración.

CUOTA SOCIETARIA:

SOCIOS	ARANCEL ANUAL
INDIVIDUALES	\$ 30
INSTITUCIONALES	\$ 100
COOPERADORES	\$ 200

Los pagos se realizarán mediante:

1.- Giro postal a nombre de:

Dra. Ana María Ambrosio - ABAC

INEVH - Monteagudo 2510

Código Postal 2700, Pergamino

2.- Por medio de depósito en cualquier sucursal del Banco Francés, en cuenta:

ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS
Nº de Cuenta Corriente en Pesos: 106-3584/5

Enviar talón por correo postal simple a:

ABAC, Julián Alvarez 1218 (C1414DRZ),
Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

El recibo será remitido por correo.

Se convoca a los Sres. Asociados que adeuden las cuotas societarias correspondientes a dos o más años, a que regularicen su situación, hasta el 31 de julio del corriente. A partir de esa fecha serán dados de baja, acorde al artículo XVII del Estatuto vigente.

ABAC en su nueva sede dispone de espacio para la realización de Conferencias.

Los interesados pueden solicitar información sobre condiciones y precios, comunicándose a:

abac_informes@yahoo.com.ar