

REVISTA

Científica

ANMAT

GUÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE DISP. 9943/19 (NANOFARMACÉUTICOS)

ARTÍCULO EXPERIMENTAL

Determinación de derivados de soja

ARTÍCULOS OBSERVACIONALES

Estabilidad de Sustancias de Referencia

Estrategias de distribución de medicamentos para VIH

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Técnica de LAMP para detección de SUH
Control de calidad de acetato de glatiramer

AUTORIDADES DE LA NACIÓN

Presidente de la Nación

Dr. Alberto FERNÁNDEZ

Jefe de Gabinete de Ministros

Lic. Santiago CAFIERO

Ministro de Salud

Dr. Ginés GONZÁLEZ GARCÍA

Secretario de Calidad en Salud

Dr. Arnaldo Darío MEDINA

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Farm. Manuel Rodolfo LIMERES - Administrador Nacional

Lic. Valeria Teresa GARAY - Sub Administradora Nacional

Revista Científica ANMAT es una revista virtual de acceso abierto y publicación semestral (junio y diciembre). Desde su génesis, la revista se constituyó en un canal de comunicación de trabajos vinculados a las actividades regulatorias en materia de productos para la salud que nuclea artículos de investigación desarrollados por profesionales de diversas disciplinas, reportes que describen la situación actual de eventos vinculados a este campo del conocimiento y artículos que revelan la mirada ante temáticas de su competencia.

Destinada a reguladores de productos para la salud, grupos de investigación, sociedades científicas, y a toda la comunidad en general, con cada publicación buscamos promover el intercambio científico de manera de sentar las bases del conocimiento, abrir el debate en materia de regulación, y generar una colección de evidencias universales y validadas que, a su vez, se constituyan en las herramientas necesarias para la toma de decisiones.

ÁREAS RESPONSABLES

Coordinación de Capacitación e Investigación en Ciencia Reguladora,

Dirección de Recursos Humanos

Karina Gabriela Balbuena. Directora.

Lorena Terrizzano. Coordinadora.

Dirección de Relaciones Institucionales

Sebastián Duarte. Director.

COMITÉ EDITORIAL

Jefe Editorial

Gabriel Leandro Lepera

Coordinadora Editorial

Cecilia Tahis Vázquez

Gestión y revisión de artículos

Gabriel Leandro Lepera

Cecilia Tahis Vázquez

Augusto Gabriel Popp

Marcelo Maito

Revisión de idioma

Noelia Rodríguez Gibú

Bibliotecaria

Natalia Favarolo

EDICIÓN GRÁFICA Y PUBLICACIÓN WEB

Rodrigo Piñeiro

Federico Tomás Torrado

ORGANISMO – EDITOR

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

Av. de Mayo 869 (C1084AAD). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

Teléfono: (+54) 11 4340 0800

Correo electrónico: revista@anmat.gob.ar / revistacranmat@gmail.com

ÍNDICE

EDITORIAL 04

Lorena Terrizzano

TRABAJOS ORIGINALES EXPERIMENTALES

Comparación de técnicas analíticas para la determinación cualitativa de derivados de soja en productos cárnicos 05

Natalia Vázquez, Gonzalo Rodríguez Girault, Matías Agnese, Enrique Flores, Marcelo Bello.

TRABAJOS ORIGINALES OBSERVACIONALES

Análisis retrospectivo de la estabilidad de Sustancias de Referencia desarrolladas por el Servicio de Sustancias de Referencia del Instituto Nacional de Medicamentos 12

Melina A. Dal Mas, Eliana N. Pasquini, Ana L. Pointner, María Cristina Vallese, Yanina I. Rodríguez, Matías E. Gómez.

Impacto de la implementación de una estrategia de checklist, trazabilidad en tiempo real y comunicación con el paciente (HELIOS-CHECK) en la adherencia al tratamiento antirretroviral en diferentes provincias de Argentina 18

Yanina Sarnagiotto, Diego M. Cecchini, Jamile Ballivian, Alejandra Gonzalez, Hugo Visciglio, Isabel Cassetti.

ENFOQUE REGULATORIO

Guía para la implementación de la Disposición ANMAT N° 9943/19: especialidades medicinales nanofarmacéuticas, doxorubicina liposomal 25

Yanina I. Rodriguez, Ana Laura Canil, Paola Carvalho, María Victoria Cid, Laura Cladouchos, Verónica Llauró, Ana Laura Rinaldi, Nadia Villar, Matías Gómez.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Diagnósticos point-of-care: amplificación isotérmica mediada por asas como alternativa para la detección y prevención del síndrome urémico hemolítico 33

Ezequiel Blanco, Rosana Alves.

Acetato de glatiramer: comparación de metodologías de control de calidad en productos comercializados en Argentina 43

Sofía Bampi, Lucía Bitonte, M. Victoria Cid, Karla Freire, Ailen García, Gastón Mariani, Dante Navalesi, Emilia Ojeda Zachara, Facundo Taborda, Regina Zaccardo, Yanina Rodriguez, Matías Gómez.

REGLAMENTO PARA AUTORES 49

EDITORIAL

En esta oportunidad, nos complace presentarles un nuevo número de la Revista Científica ANMAT. El presente lanzamiento se da en el marco de un arduo trabajo institucional que viene siendo realizado debido a la emergencia sanitaria que estamos viviendo y a los cambios en la organización del trabajo que la misma ha producido.

En este contexto, de manera de promover el debate y dando difusión a los avances en el campo regulatorio, la Administración se propuso reimpulsar nuestra revista científica institucional con cambios que no sólo se limitan a su nueva denominación, sino que apuntan a la inclusión de contenido científico técnico de excelencia, con artículos originales producidos tanto por las diversas áreas de ANMAT, así como por investigadores externos de nuestro país. Por ello, desde todos los sectores responsables de la planificación, evaluación del contenido y edición de la revista, se trabaja para lograr un producto de altísima calidad e interés para un público diverso que incluye a la industria de productos para la salud, universidades, grupos de investigación, reguladores y fiscalizadores a nivel nacional, provincial y municipal; y todos aquellos lectores interesados en una publicación con alto contenido científico regulatorio.

En línea con lo expresado, me interesa remarcar algunas características de este nuevo número. Por un lado, mencionar que la mitad de los artículos presentados fueron producidos por profesionales de nuestra institución e incluyen trabajos diversos tales

como una guía sobre regulación de un producto nanotecnológico, un estudio retrospectivo de larga data sobre la estabilidad de Sustancias de Referencias elaboradas por ANMAT (Servicio de Sustancias de Referencias de INAME) y una revisión sobre el control de calidad de los productos que contienen acetato de glatiramer de autoría de residentes de INAME. Por otro lado, resulta muy grato destacar la alta participación de investigadores externos a la institución, a través de los artículos de Natalia Vázquez y col. (SENASA) sobre comparación de técnicas analíticas para la determinación de derivados de soja en productos cárnicos, Ezequiel Blanco y col. (HIGA Eva Perón-Hospital Penna) sobre una nueva metodología de análisis para la prevención de una enfermedad altamente prevalente en nuestro país como el Síndrome Urémico Hemolítico, y Yanina Sarnagiotto y col. (Helios-Fundación Helios) sobre una nueva metodología de distribución de medicamentos para mejorar la adherencia de pacientes HIV positivos. De lo mencionado, me interesa destacar especialmente el gran trabajo intersectorial realizado por profesionales de la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo de INAME para la elaboración de una guía para la implementación de la Disposición N°9943/19, que marca una línea regulatoria sobre la evaluación de productos nanotecnológicos basados en liposomas, tales como aquellos que contienen doxorubicina liposomal. Desde ya, invitamos a todos aquellos investigadores que deseen formar parte de futuras publicaciones de nuestra revista.

Ing. Lorena Terrizzano

Coordinadora de Capacitación e Investigación
en Ciencia Reguladora

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE DERIVADOS DE SOJA EN PRODUCTOS CÁRNICOS

Comparison of analytical techniques for qualitative detection of soybean derivatives in meat products

Natalia Vázquez, Gonzalo Rodríguez Girault, Matías Agnese, Enrique Flores, Marcelo Bello.

Departamento de Evaluación y Desarrollo, Coordinación de Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal, Dirección de Laboratorio Animal, Dirección de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Buenos Aires, Argentina.

Contacto: nvazquez@senasa.gob.ar

Recibido: 1 de octubre de 2020. Aprobado: 18 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El adecuado rotulado de los alimentos es muy importante ya que la falta de información puede ser perjudicial para el consumidor. En nuestro país, el SENASA es responsable de la fiscalización de los establecimientos que elaboran alimentos cárneos y, estos productos, a su vez, se encuentran normados en el Capítulo VI del Código Alimentario Argentino. Dicha normativa permite la adición de derivados de soja en chacinados como ligantes y/o extensores, mientras que en las salazones está prohibido su uso. En este marco, el objetivo de este trabajo fue comparar las técnicas de microscopía, enzimoimmunoanálisis y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (ELISA y Real time-PCR, por sus siglas en inglés respectivamente) para la detección de soja en productos cárnicos. Para ello se analizaron 4 matrices de chacinados y salazones fortificados con derivados de soja al 1% y 20 muestras comerciales. En todas las muestras fortificadas se detectó la presencia de soja por las tres metodologías y la totalidad de las muestras comerciales se encontró conforme con la legislación. Si bien, las tres técnicas son aptas para el objetivo planteado, se puede concluir que la microscopía tiene la ventaja de ser de bajo costo, aunque es limitada la cantidad de muestras que se pueden observar simultáneamente y depende de la pericia del analista. La técnica ELISA tiene la desventaja del costo de los kits comerciales y que se deben reunir cierta cantidad de muestras para optimizar su uso. Y, finalmente, el método basado en la detección de ADN permite analizar gran cantidad de muestras en forma simultánea en poco tiempo, y con alta sensibilidad y especificidad; considerando esto sumado a la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración de los alimentos, la técnica de PCR se presenta como una herramienta alternativa y confiable para el control de los mismos. En adición, un desarrollo más específico del método cualitativo de PCR permitirá, a futuro, cuantificar el contenido de soja en diversas matrices alimentarias.

Palabras clave: Soja, microscopía, ELISA, real time PCR.

ABSTRACT

Proper food labeling is very important since lack of information can be detrimental to the consumer. In our country, SENASA is the organization responsible for the inspection of establishments that manufacture meat products, and these products, in turn, are regulated by Chapter VI of the Argentine Food Code. This regulation allows the addition of soybean derivatives in sausages as binders and/or extenders, but, the use in cured meats is prohibited. The aim in this framework was to compare the techniques of microscopy, enzyme immunoassay and real-time polymerase chain reaction (ELISA and Real-Time PCR, respectively) for the detection of soybean in meat products. For this purpose, 4 matrices of sausages and cured meats fortified with 1% soybean derivatives and 20 commercial samples were analyzed. In all fortified samples, the presence of soybean was detected by the three methodologies, and all commercial samples were in compliance with the legislation. Although the three techniques are suitable for the proposed objective, it can be concluded that microscopy has the advantage of being low cost, however, the number of samples that can be observed simultaneously is limited and depends on the expertise of the analyst. One disadvantage of the ELISA technique is the cost of commercial kits, also, that a certain amount of samples must be gathered to optimize its use. Finally, the method based on DNA detection allows to analyze a large number of samples simultaneously in a short time with high sensitivity and specificity; considering this, as well as the stability of the DNA molecule against heat treatments used in food processing, the PCR technique is presented as a reliable alternative tool. In addition, a more specific development of the Qualitative PCR method will allow, in the future, to quantify the content of soybean in different food matrices.

Keywords: Soybean, microscopy, ELISA, real-time PCR.

INTRODUCCIÓN

El rotulado de alimentos tiene por objeto suministrar al consumidor información sobre características particulares de los mismos, tales como su forma de preparación, manipulación, conservación, composición y propiedades nutricionales. En este sentido, es importante que la información sea acorde al producto que se comercializa y se ajuste a la legislación vigente, de otra manera, la falta de cumplimiento de estos requisitos puede derivar tanto en un engaño al consumidor, como en un riesgo para su salud.

Algunos ejemplos pueden ser el agregado de sustancias para enmascarar ingredientes de menor calidad, la sustitución de un ingrediente o un alimento por otro sin hacer mención en la etiqueta, o las declaraciones falsas en el origen o procedencia de las materias primas.

La proteína de soja es muy utilizada en la industria cárnica debido a sus propiedades físico-químicas, composición y bajo costo^[2]. La misma es de fácil producción por tratarse de un derivado secundario de la obtención de aceite a partir de soja. Su extracción y el grado de purificación alcanzado a partir del poroto de soja, permite obtener diversos ingredientes como: harina de soja, concentrado de soja y aislado proteínico de soja, cuyos contenidos proteicos son de aproximadamente 50, 70 y 90 %, respectivamente. La calidad de cada uno de estos productos se encuentra normada por el Capítulo XIX del Código Alimentario Argentino^[3]. Por otra parte, en el capítulo VI se encuentra reglamentada la utilización de derivados de soja en determinados alimentos cárnicos. En estos últimos, dichos ingredientes son utilizados para cumplir una función tecnológica específica, como ser ligantes en la formación de la emulsión agua-grasa realizando además un aporte nutricional, de ahí su doble función de aditivo e ingrediente. De todas maneras, y para no terminar provocando una sustitución de las proteínas de origen animal características de estos alimentos, su contenido en el producto final se encuentra estrictamente regulado.

Para clasificar su uso se pueden definir entonces, dos grandes grupos de alimentos cárnicos: las salazones y los chacinados. En la elaboración de salazones no se permite el agregado de derivados de la soja en su composición. En el caso de los chacinados, se permite el agregado de concentrado y/o aislado de soja hasta un máximo de 2% en peso referido al producto terminado. Para éstos, se permite además el agregado de cualquier derivado de soja hasta un máximo de 10% en base seca en el producto terminado, si este contenido se declara en su denominación. Una de las funciones del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria es controlar el cumplimiento de dicha reglamentación.

En la actualidad existen diversos métodos para determinar la presencia de soja y sus derivados en distintos componentes alimenticios^[8,9,11]. Entre los más utilizados se encuentran los kits de enzimo-inmunoanálisis (ELISA, por sus siglas en inglés) comerciales que permiten determinar la presencia de proteína de soja en diversas matrices alimentarias. Su alto costo y la

necesidad de contar con un gran número de muestras para optimizar su rendimiento, llevan a la búsqueda de alternativas que permitan obtener resultados igualmente satisfactorios. Ante tal desafío, el objetivo de este trabajo se basó en el estudio y comparación de distintas técnicas analíticas para la detección de soja en productos cárnicos de manera de otorgar diversas alternativas que permitan dar cumplimiento a los requisitos de la legislación vigente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra: Se analizaron, en una primera instancia, 4 matrices distintas de chacinados y salazones (M1 a M4) fortificados al 1% con harina de soja desgrasada (H) y aislado proteico de soja (A) de manera de cubrir un amplio espectro de productos cárnicos e ingredientes utilizados habitualmente en la industria frigorífica. Las matrices utilizadas fueron:

- Jamón cocido (M1)
- Jamón crudo (M2)
- Salchicha fresca (M3)
- Hamburguesa (M4)

Las muestras fueron homogeneizadas en picadora antes y después de las fortificaciones correspondientes. Una vez finalizada esta etapa, se procedió a su análisis por los distintos métodos analíticos que se detallan a continuación.

Muestras comerciales: Se analizaron 20 muestras comerciales que incluyeron salazones cocidas y chacinados embutidos y no embutidos, frescos, secos y cocidos.

Métodos Analíticos

Microscopía

El método utilizado está basado en AOAC 913.01 (AOAC, 2012)^[1]. Sobre 2,5 gramos de cada muestra se realizó una digestión básica con solución alcohólica de hidróxido de potasio al 8% en estufa a 100°C durante una hora. Posteriormente, se agregó alcohol 96%, se agitó y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* obtenido se adicionaron 25 ml de agua caliente. Se dejó reposar hasta que se asentara la espuma y luego se centrifugó (HERMIE Z400K) 15 minutos a 3500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml ácido clorhídrico y 7.5 ml de etanol al 25%. Se centrifugó 15 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y se homogeneizó el residuo. Se montó el homogeneizado con micropipeta sobre un portaobjeto, se colocó un cubreobjeto y se procedió a la observación microscópica con un microscopio óptico binocular (Nikon Eclipse 50i) provisto de luz polarizada (Nikon C-SP 757196).

ELISA

Se utilizó un kit comercial 3M™ Kit ELISA Soy Protein (E96SOY 70-2011-7571-1-7100151351)^[7]. A 0.5 gramos de muestra se le agregaron 4.5 ml de *buffer* de extracción suministrado por el kit precalentado (UNITRONIC 100, P-SELECTA) a 50°C. Los tubos fueron incubados en un baño termostatzado a 50°C durante 25 minutos y cada 5 minutos fueron agitados manualmente durante

1 minuto. Luego de la incubación se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 segundos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se mezclaron con 900 µl de la solución diluyente del kit, con agitación durante 20 segundos en vortex. De esta solución se tomaron 100 µl y se procedió a la realización del ensayo según el manual^[7]. Una vez finalizado, se midieron las absorbancias de los estándares que provee el kit y de las muestras a 450 nm en un lector de microplacas (Biotek ELX-808). El rango analítico del método está comprendido entre 20 y 600 mg/kg, aproximadamente.

PCR

Extracción de ADN: existen numerosas publicaciones con diversos métodos de extracción de ADN para los productos de soja y sus derivados^[5]. En este caso se realizó utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio que permite el análisis de identificación de especies en productos cárnicos^[13]. Las muestras se procesaron según lo descrito en Tartaglia y col (1997)^[12]: a 1 gramo de muestra se le agregaron 4 ml de *buffer* de extracción de tiocianato de guanidina y 10 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml). Se homogeneizó en vortex por 10 segundos y se incubó en baño termostático a 60°C durante 90 minutos. Una vez finalizada la incubación, los tubos se conservaron en heladera por 15 minutos. Terminada esta etapa, se centrifugaron a 6°C y 3500 rpm durante 15 minutos. Se trasvasaron 900 µl del sobrenadante a un tubo tipo eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. A 500 µl de sobrenadante se le agregaron 500 µl de *buffer* de extracción, 40 µl de una suspensión de sílica en agua, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación constante. Se centrifugó (SIGMA I-14) a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Al *pellet* residual se lo lavó tres veces por resuspensión y posterior centrifugación con 1 ml de *buffer* de lavado, dos veces con 1 ml de etanol 70% y una vez más con 1 ml de acetona.

El *pellet* se dejó secar en estufa a 20°C durante 60 minutos aproximadamente, se le agregó 50 µl de solución *Buffer* Tris-EDTA (pH=7.5) y, previa agitación, se incubó por 10 minutos a 56°C en baño termostático. Una vez finalizado se centrifugó a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo, y se centrifugó a 13000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. Este paso se repitió dos veces más a fin de eliminar los posibles restos de sílica que pudieran quedar en el sobrenadante y que interfieren en la reacción de amplificación del ADN. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su corrida.

Primer y sondas de hidrólisis: Se utilizaron las secuencias definidas por Popping y col (2010)^[10]:

- *Primer Lectin Forward:* 5'TCC ACC CCC ATC CAC ATT T 3'
- *Primer Lectin Reverse:* 5'GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA3'
- Sonda de hidrólisis *Lectin Probe:* 5'(6-FAM) AAC CGG TAG CT TGC CAG CTT CG 3'con marcación FAM – TAMRA.

Condiciones de corrida: El análisis se realizó en un termociclador (ROCHE LightCycler 2.0), utilizándose capilares de 20 µl para las distintas corridas. En los capilares se agregaron 10 µl de master mix (QuantiTec Probe PCR Kit, Qiagen)^[6], 0.9 µl de *primer Lectin Forward* (10uM), 0.9 µl *primer Lectin Reverse* (10 µM), 0.4 µl de sonda *Lectin Probe* (5 µM), 0.4 µl de solución MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de Albúmina de Suero Bovino (BSA), 0.5 µl de Uracil DNA Glicosilasa (UNG), 2.4 µl de agua provista por el kit y 4 µl del volumen del extracto de cada muestra a analizar y de los controles positivos (harina de soja desgrasada y aislado proteico de soja) y negativo (blanco de reactivos).

Las condiciones de amplificación fueron:

- 1 ciclo de activación para la UNG de 50°C durante 2 minutos
- 1 ciclo de activación para la ADN polimerasa a 95°C por 15 minutos
- 35 ciclos de desnaturalización del ADN doble a 95°C por 15 segundos
- Hibridación de los *primers* y elongación a 60°C durante 1 minuto
- 1 ciclo enfriamiento a 40°C durante 30 segundos.

RESULTADOS

Microscopía

La metodología permitió identificar en todas las muestras fortificadas al 1% con harina de soja desgrasada y aislado proteico de soja, la presencia de estructuras celulares con forma de reloj de arena características de la soja (Ferrado y Henry, 1967)^[4] (**Figura 1**). Ninguna de estas estructuras se observó en los controles sin fortificar. Según puede verse, las muestras fortificadas con harina, presentaron un mayor número de estructuras celulares de soja en relación con las muestras fortificadas con aislado, mostrando incluso el formato de lo que se conoce como tortas de soja dispuestas, en este caso, de manera lateral. La composición y proceso de elaboración de ambos derivados de la soja podrían ser la causa de tales diferencias. Así, la harina de soja presenta muchos más restos vegetales ya que deriva directamente de la molienda y desgrasado del grano, mientras que el aislado proteico de soja tiene muchos más pasos de elaboración para lograr alcanzar el porcentaje de proteína cercano al 90%.

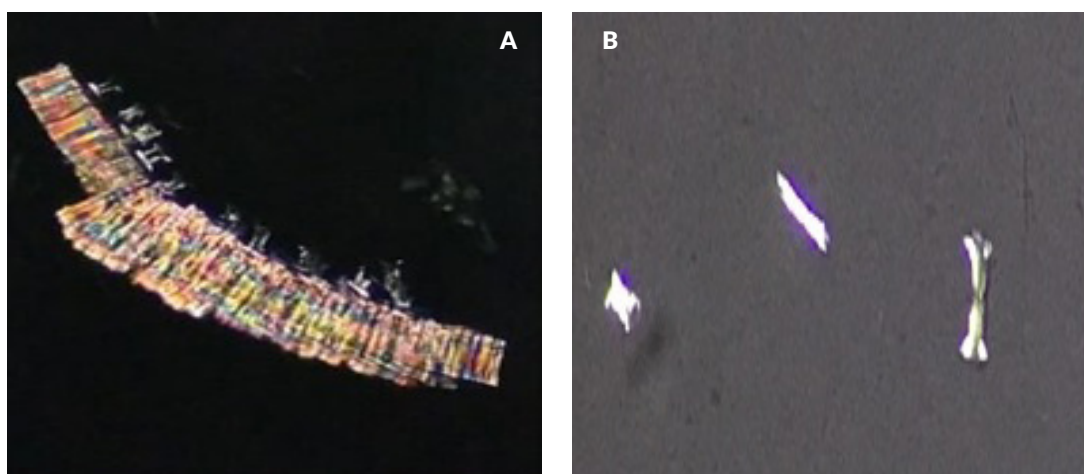


FIGURA 1. A. TORTA DE SOJA OBSERVADA EN EL EXTRACTO DE UNA MUESTRA DE SALCHICHA FRESCA FORTIFICADA AL 1% CON HARINA DE SOJA. OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIO ÓPTICO BINOCULAR, A 100X CON LUZ POLARIZADA. B. ESTRUCTURAS CELULARES DE SOJA OBSERVADAS EN EL EXTRACTO DE UNA HAMBURGUESA FORTIFICADA AL 1% CON AISLADO DE SOJA. OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIO ÓPTICO BINOCULAR, A 100X CON LUZ POLARIZADA.

ELISA

En la **Tabla 1** se presentan los datos obtenidos para las distintas matrices analizadas con y sin fortificación. Los resultados muestran una alta sensibilidad de esta metodología para los distintos productos independientemente del patrón de soja utilizado para fortificar. Cabe destacar que los valores de absorbancia encontrados permiten suponer que el límite de detección del ELISA se encuentra muy por debajo de los niveles

de fortificación utilizados. De todas maneras, a los fines de detectar la adulteración en un producto cárnico, esta propiedad no parece ser una cuestión determinante.

El método, debido a su alta sensibilidad, se presenta como una opción a considerar a la hora de evaluar la presencia de proteína de soja en el control de alérgenos en alimentos.

TABLA 1: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ELISA DE LOS ESTÁNDARES DEL KIT Y LAS MATRICES CON Y SIN FORTIFICACIÓN.

Muestra	Absorbancia a 450 nm	Resultado cualitativo
Blanco reactivos	0.281	-
Standard 1 kit	0.365	+
Standard 2 kit	0.941	+
Standard 3 kit	1.977	+
Standard 4 kit	2.787	+
Harina soja desgrasada (H)	>3.000	+
Aislado proteico de soja (A)	>3.000	+
M1 (Jamón cocido)	0.105	-
M2 (Jamón crudo)	0.168	-
M3 (salchicha fresca)	0.289	-
M4 (hamburguesa)	0.125	-
M1 + 1% H	>3.000	+
M1 + 1% A	>3.000	+
M2 + 1% H	>3.000	+
M2 + 1% A	>3.000	+
M3 + 1% H	>3.000	+
M3 + 1% A	>3.000	+
M4 + 1% H	>3.000	+
M4 + 1% A	>3.000	+

PCR

En la **Tabla 2** pueden observarse los resultados obtenidos para las corridas de PCR. Según puede verse, los mismos son comparables a los obtenidos por las técnicas anteriormente estudiadas, con valores de *crossing point* (Cp) comprendidos entre 23 y 31 ciclos para las muestras en las que se detectaron derivados de soja. No se observó amplificación en las corridas de las matrices que no fueron fortificadas.

En la **Figura 2** se muestran las corridas obtenidas para los patrones de fortificación y para jamón cocido fortificado con los distintos patrones utilizados, respectivamente. El método presenta buena sensibilidad para todas las opciones

analizadas y permite detectar la presencia de derivados de soja a concentraciones características de posible adulteración. **Análisis de muestras comerciales:** Al analizar un amplio abanico de productos cárnicos (**Tabla 3**), se obtuvieron resultados similares para las tres metodologías utilizadas, mostrando además que los mismos cumplían con la legislación. Las distintas técnicas mostraron una alta especificidad y sensibilidad para los fines propuestos, independientemente de la matriz estudiada.

En la **Figura 3** pueden observarse las corridas por PCR de algunos de los alimentos analizados.

TABLA 2: RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA CORRIDA POR PCR DE LOS ESTÁNDARES DEL KIT Y LAS MATRICES CON Y SIN FORTIFICACIÓN.
ND: no se detecta. Cp: valor de *crossing point* obtenido.

Muestra	Cp	Resultado cualitativo
Harina soja desgrasada (H)	23.30	+
Aislado proteico de soja (A)	29.20	+
M1 (Jamón cocido)	ND	-
M2 (Jamón crudo)	ND	-
M3 (salchicha fresca)	ND	-
M4 (hamburguesa)	ND	-
M1 + 1% H	30.12	+
M1 + 1% A	28.49	+
M2 + 1% H	30.09	+
M2 + 1% A	29.51	+
M3 + 1% H	30.83	+
M3 + 1% A	28.21	+
M4 + 1% H	29.27	+
M4 + 1% A	27.91	+

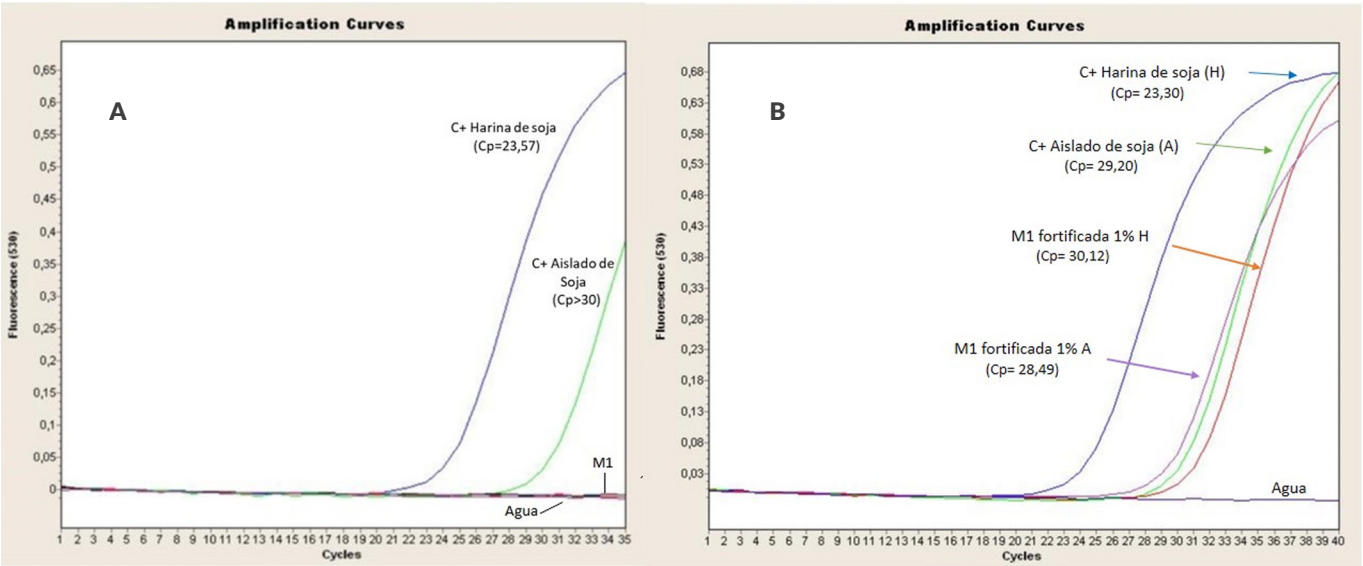


FIGURA 2. A. CORRIDAS DE PCR PARA EL JAMÓN COCIDO (M1) SIN FORTIFICAR Y PARA LOS PATRONES HARINA DE SOJA DESGRASADA Y AISLADO PROTEICO DE SOJA. B. CORRIDAS DE PCR PARA LA MUESTRA DE JAMÓN COCIDO FORTIFICADO Y PARA LA HARINA DE SOJA DESGRASADA Y EL AISLADO PROTEICO DE SOJA.

TABLA 3: RESULTADOS OBTENIDOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES POR LAS TRES METODOLOGÍAS PROPUESTAS.

ND: no se detecta; SD: se detecta; Cp: valor de crossing point obtenido.

Muestra	Microscopia	ELISA	PCR
Jamón cocido con cuero	Ausencia	ND	ND
Jamón cocido	Ausencia	ND	ND
Lomo de cerdo	Ausencia	ND	ND
Lomo Horneado	Ausencia	ND	ND
Espetec	Ausencia	ND	ND
Panceta salada 1	Ausencia	ND	ND
Pernil de cerdo	Ausencia	ND	ND
Panceta salada 2	Ausencia	ND	ND
Chorizo fresco	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 1	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 2	Ausencia	ND	ND
Hamburguesa 3	Ausencia	ND	ND
Medallones de carne vacuna	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Salchicha cocida 1	Presencia	SD	SD (Cp=27,34)
Salchicha cocida 2	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Salchicha cocida 3	Presencia	SD	SD (Cp=28,39)
Mortadela	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Embutido cocido a base de cerdo	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Fiambre cocido de paleta de cerdo	Presencia	SD	SD (Cp>30,00)
Matambre Vacuno arrollado	Ausencia	ND	ND

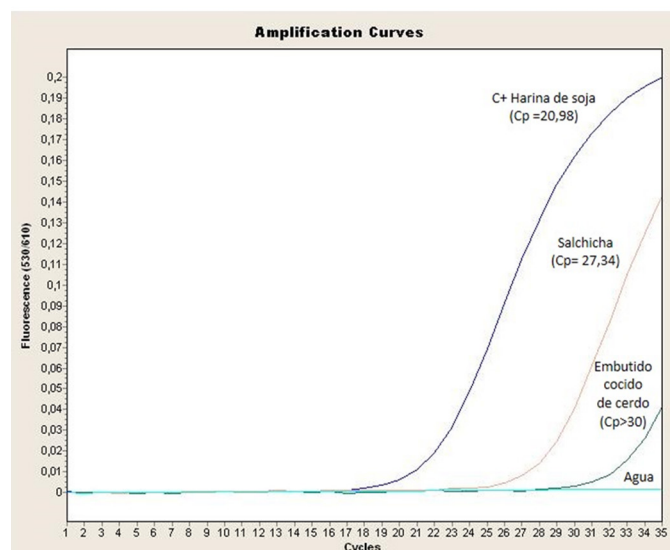


FIGURA 3. CORRIDAS DE PCR PARA EL PATRÓN DE HARINA DE SOJA DESGRASADA Y PARA LAS MUESTRAS COMERCIALES DE LOMO DE CERDO, SALCHICHA Y EMBUTIDO COCIDO DE CERDO.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado la utilidad de la soja por sus propiedades tecnológicas y biofuncionales, y la industria la ha incorporado a numerosos productos del rubro alimenticio como la leche y sus derivados, los cárnicos, los farináceos, productos para mascotas, vitaminas y hasta en cosméticos. Asimismo, hay que tener en cuenta su gran poder alergénico, sobre todo en infantes y niños pequeños. Dado que en la actualidad no existe una cura para las alergias, la única manera eficaz de prevenirlas es eliminar los alérgenos de la dieta. La detección analítica de los alérgenos alimentarios permitiría minimizar el riesgo de episodios en personas sensibles, y maximizar las posibilidades de elección de alimentos nutritivos por parte de los consumidores. Los alérgenos alimentarios más comunes intervienen en una gran variedad de alimentos elaborados y cada uno de los principales alérgenos contienen múltiples proteínas, muchas de las cuales no han sido caracterizadas. Es por ello que la trazabilidad y el etiquetado de los productos comercializados se consideran factores importantes para solucionar esta problemática. La necesidad de cumplir con estos requisitos legales hace necesario disponer de técnicas analíticas altamente sensibles y precisas para lograr un etiquetado confiable y comprobable científicamente.

Es por ello que a lo largo del tiempo han surgido diferentes metodologías analíticas para su detección.

A estos fines, la microscopía se ha constituido como una técnica sencilla, de muy bajo costo que requiere únicamente de un microscopio óptico con luz polarizada o polarizador. Pero es limitada la cantidad de muestras que pueden observarse simultáneamente ya que la extracción se realiza por duplicado y depende principalmente de la pericia y la experiencia del analista. El ensayo inmunoenzimático (ELISA), por otro lado, es una herramienta de análisis poderosa para la detección de proteínas específicas. Su ventaja radica en la capacidad de análisis de numerosas muestras en simultáneo con altos niveles de sensibilidad y en que no requiere el uso de gran cantidad de instrumental. En este caso, ofrece la posibilidad de cuantificar proteína de soja, por la curva de calibración empleada, aunque es necesario optimizar su rendimiento por el alto costo que actualmente tienen estos kits comerciales. Su principal desventaja es que no permite detectar a las proteínas desnaturalizadas, lo que puede ocurrir durante el proceso de elaboración de los alimentos procesados, ya que se altera la interacción conformacional de la reacción antígeno (proteína de soja)-anticuerpo. Un ejemplo de esto puede ser la proteína hidrolizada de soja usada como aditivo aromatizante.

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real, hay que tener en cuenta que no se detecta la proteína de soja específicamente, sino una secuencia de ADN específica, que suele ser el gen de la lecitina de soja. Permite el análisis simultáneo de una gran cantidad de muestras con alta sensibilidad y especificidad, y la obtención de los resultados sucede a tiempo real, es decir, a medida que la amplificación del gen en cuestión va ocurriendo. Esto acorta mucho los tiempos de análisis, pero el pre-tratamiento de las muestras en la etapa de extracción de ADN es extenso. Y aunque pueden emplearse procedimientos *in-house* o kits comerciales, lo cierto es que estos suelen ser costosos. Además, depende también de la complejidad de la matriz alimentaria analizada. En el caso de los productos cárnicos, el alto contenido de grasa se presenta como una barrera difícil de sortear que hace compleja la etapa de extracción de ADN.

Analizando los resultados obtenidos, es posible afirmar que en todas las muestras fortificadas se detectó la presencia de derivados de soja por las tres metodologías, y la totalidad de las muestras comerciales se encontraron conformes con la legislación, con lo cual el objetivo propuesto para el presente trabajo fue cumplido.

Considerando las ventajas y desventajas de los tres métodos analizados, y teniendo en cuenta la estabilidad de la molécula de ADN frente a los tratamientos térmicos utilizados en la elaboración de los alimentos, la técnica de PCR se presenta como una herramienta alternativa y confiable para el control de los mismos. El desarrollo a futuro del método de Real Time PCR, permitirá cuantificar el contenido de soja en diversas matrices alimentarias, ya que también existe la posibilidad de realizar una curva de calibración para evaluar el contenido de soja y derivados en diversos productos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- AOAC Official Methods of Analysis 19th Ed. (2012), Method 913.01 Soybean Flour in Meat, Qualitative Test.
- 2- Belloque. J; García M. C.; Torre M, and. Marina M. L. Analysis of Soybean Proteins in Meat Products: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2002; 42(5):507-532.
- 3- Código Alimentario Argentino, Ley 18.284, Decreto 2126/1971.
- 4- Ferrado R; Henry N. Editorial Acribia, Determinación Microscópica de los componentes de los piensos S.A.; Edición: 1; 1967.
- 5- Mafra, I.; Silva, S.; Moreira, E y colaboradores. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. Food Control 19. 2008; 1183 - 1190.
- 6- Manual del QuantiTec Probe PCR Kit - For quantitative, Real time PCR and two-step RT- PCR using sequence-specific probes Marca Qiagen.
- 7- Manual 3M Kit ELISA Soja.
- 8- Meyer. R; Chardonnens. F; Hubner. P; Luthy. J. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. Springer-Verlag. 1996; 203: 339-344.
- 9- Montserrat. E; Herrero. B; Vieites. JM; Santaclara. F. Validation of end-point and real-time PCR methods for the rapid detection of soy allergen in processed products. Food Additives & Contaminants: Part A. Volume 27, 2010 - Issue 4.
- 10- Popping. B; Diaz-Amigo. C; Hoenicke. K; Gatti. M; Ferreti. C. Soy Allergen Detection, Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists Chapter 17, Microbiotech Department, Neutron S.p.a, Modena, Italy. 2010. ISBN: 978-0-470-63768-5.
- 11- Soares. S; Mafra. I; Amaral. J; Oliveira. M.B. A PCR assay to detect trace amounts of soybean in meat sausages. International Journal of Food Science and Technology. 2010; 45, 2581-2588.
- 12- Tartaglia. M; Saulle. E; Pestalozza. S; Morelli. L; Antonucci. G; Battaglia. P. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials., Journal of Food Protection. 1998; Vol 61, N 5, 513-518.
- 13- Vázquez. N; Bachur. S; Bello. M; Binotti. S. Identificación de Especies de Origen animal en productos cárnicos por PCR en Tiempo real; S./Revista Ingeniería Alimentaria, / 111. 2014; 46-50.

ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE LA ESTABILIDAD DE SUSTANCIAS DE REFERENCIA DESARROLLADAS POR EL SERVICIO DE SUSTANCIAS DE REFERENCIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICAMENTOS

Retrospective analysis of the stability of reference substances developed by the Reference Substances Service of the National Institute of Medicines

Melina A. Dal Mas*, Eliana N. Pasquini*, Ana L. Pointner*, María Cristina Vallese, Yanina I. Rodríguez, Matías E. Gómez.

Servicio de Sustancias de Referencia, Departamento de Laboratorio Nacional de Control, Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, Instituto Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: sr@anmat.gov.ar

**Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo de este trabajo.*

Recibido: 1 de febrero de 2019. Aprobado: 27 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El desarrollo de una Sustancia de Referencia (SR) es un proceso laborioso en el cual deben cumplirse de manera rigurosa una serie de etapas llevadas a cabo sobre un material homogéneo y de pureza adecuada. Las condiciones de conservación elegidas para las sustancias en desarrollo deben ser estudiadas y consignadas para mantener, en el tiempo, la calidad del material y su integridad, evitando cualquier posible degradación. La calidad de las SR influye en el resultado del control de calidad de una materia prima o especialidad medicinal que la contenga, por lo tanto, resulta importante tener en cuenta que, si se presenta un deterioro en ella, los resultados obtenidos pueden afectar el cumplimiento de los requisitos técnicos especificados. El propósito principal de este trabajo fue demostrar de manera retrospectiva, la importancia de realizar un seguimiento y evaluación del perfil de pureza para no asignar una fecha de vencimiento arbitraria, evitando el descarte de material en buen estado. Para ello se recurrió a evaluar la variación de diversos atributos (porcentaje de impurezas presentes, contenido de agua o porcentaje de humedad, valoración y pureza cristalina) de diversas Sustancias de Referencias elaboradas por el Servicio de Sustancias de Referencias del Instituto Nacional de Medicamentos. Como resultado, se observó una muy baja variabilidad en los distintos atributos evaluados, lo cual podría indicar que dichas sustancias mantienen sus propiedades en el tiempo y que el reanálisis periódico de control podría ser una estrategia adecuada para evitar un descarte innecesario.

Palabras clave: Sustancias de Referencia, estabilidad, calidad.

ABSTRACT

The development of a Reference Substance (RS) is an elaborate procedure in which a series of stages must be rigorously carried out on a homogeneous material of adequate purity. The storage conditions chosen for the source material must be studied and established to maintain its quality and integrity over time, avoiding any possible degradation. The quality of the RS impacts on the quality assurance of the raw material or medicinal specialty which contains it, therefore, it is important to consider that, if any deterioration is found in the RS, the results obtained may affect compliance with the specified technical requirements. The main purpose of this research work was to prove retrospectively the importance of monitoring and evaluating the purity profile in order not to assign an arbitrary expiration date, avoiding the discarding of undamaged material. For this purpose, various attributes (percentage of impurities, water content or humidity percentage, assay, and crystalline purity) of different RS made by the Reference Substances Service of the National Institute of Medicines were evaluated. As a result, a very low variability was observed in the diverse attributes evaluated, which could indicate that these substances preserve their characteristics over time and that a periodic re-assessment could be a suitable strategy in order to prevent unnecessary discarding.

Keywords: Reference substances, stability, quality.

INTRODUCCIÓN

Una Sustancia de Referencia (SR) es un material de uniformidad comprobada cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se comparan sus propiedades con las de un producto en análisis y, además, posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina^[1]. Estos materiales, que permiten al usuario obtener resultados precisos y trazables, se usan para identificar, determinar la pureza o cuantificar ingredientes farmacéuticos activos en su control de calidad y en el control de los productos farmacéuticos que los contengan. También son útiles en la verificación del correcto funcionamiento de instrumentos y para corroborar o poner a punto los métodos analíticos aplicados.

Asimismo, la Autoridad Sanitaria establece el uso de materiales de referencia adecuados para el control de calidad de los productos farmacéuticos como requerimiento básico para la fabricación, importación/exportación de medicamentos^[2].

Considerando que la calidad de las SR influye en el resultado del control de calidad de una materia prima o especialidad medicinal que la contenga, es importante tener en cuenta que, si se presenta un deterioro en ella, los resultados obtenidos pueden afectar el cumplimiento de los requisitos técnicos especificados. Por ello, el desarrollo de SR es un proceso crítico en el cual deben cumplimentarse una serie de etapas. Dicho proceso requiere de lineamientos adecuados que abarquen el análisis, fraccionamiento, acondicionamiento, conservación, distribución y re-análisis de dichas sustancias. Asimismo, se deben aplicar los recaudos apropiados durante el desarrollo, almacenamiento y distribución para garantizar que sean adecuadas para el uso previsto. Todas las operaciones deben llevarse a cabo bajo un sistema de gestión de calidad definido^[3].

Como establece la Organización Mundial de la Salud (OMS), el desarrollo, establecimiento y control de materiales de referencia de las Farmacopeas requiere un esfuerzo continuo, el cual incluye estudios de idoneidad para su uso, estudios de estabilidad, investigación de nuevos materiales de referencia para la codificación de nuevas monografías y para la actualización de las ya existentes, y el estudio de materiales candidatos para lotes de reemplazo^[4].

Durante el proceso de fraccionamiento de los ingredientes farmacéuticos activos a ser utilizados para la elaboración de una SR, el control de las condiciones ambientales (luz atenuada, temperatura y humedad) es de significativa importancia en la calidad final de los estándares desarrollados dado que permite evitar la degradación térmica o lumínica, como así también la absorción de humedad por parte del material con sus consecuentes alteraciones fisicoquímicas. En este sentido, garantizar la hermeticidad de los viales también es fundamental, por lo que debe controlarse también durante el proceso de acondicionamiento previo a su conservación en las condiciones de temperatura recomendada.

La fecha de vencimiento identifica el fin de la vida útil de un producto, período durante el cual deberá cumplir con sus requisitos de calidad, siempre que éste se conserve en las condiciones de almacenamiento establecidas^[5]. Sin embargo,

en el caso de las SR, la asignación de una fecha de vencimiento prematura podría conducir al descarte de materiales en buen estado. Es así que mediante la realización de ensayos de estabilidad periódicos sobre las SR es posible evaluar si las propiedades y atributos de calidad se mantienen dentro de los requerimientos propuestos, evitando establecer una fecha de caducidad arbitraria. Los controles periódicos tienen como finalidad la búsqueda y el análisis de indicios de degradación y/o contaminación mediante ensayos que permiten la estimación de impurezas, tales como cromatografía en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), contenido de agua por coulombimetría, pérdida de masa por pérdida por secado (PPS) o termogravimetría (TG), determinación del rango de fusión y pureza cristalina por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), como así también, ensayos de valoración aplicando técnicas potenciométricas o cromatográficas para evaluar su título en el transcurso del tiempo. Además, tal como se mencionó, cualquier deterioro de la SR influye en el control de calidad de una materia prima o de la especialidad medicinal que la contiene, por lo tanto es de suma importancia que su estabilidad se vigile en períodos regulares y que esas SR sean sustituidas en cuanto se observa un cambio de importancia en alguna de sus propiedades^[6].

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis retrospectivo sobre la variación en los atributos de calidad (porcentaje de impurezas presentes, contenido de agua o porcentaje de humedad, valoración, y pureza cristalina) de diversas SR, evaluadas en distintos años, como parámetro indicativo de la estabilidad de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se relevó la documentación correspondiente a los ensayos periódicos de estabilidad que se realizaron sobre diversas SR desarrolladas por el Servicio de Sustancias de Referencias del Laboratorio Nacional de Control de la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgos del Instituto Nacional de Medicamentos (INAME).

Para la revisión de documentación se incluyeron las siguientes SR: Ácido 6-Aminopenicilánico Impureza de Sulbactam (6-APA) Control N° 111006/6-APA, Clorhidrato de Amiodarona Control N° 107001, Atenolol Control N° 199041, Betametasona Control N° 189029, Clorhidrato de Ciprofloxacina Control N° 102044, Maleato de Clorfeniramina Control N° 181013, Clordiazepóxido Control N° 181015, Bromhidrato de Dextrometorfán Control N° 183019, Clorhidrato de Dextropropoxifeno Control N° 179009, Clorhidrato de Difenhidramina Control N° 183018, Maleato de Enalapril Control N° 110004, Fenobarbital Control N° 112009, Glibenclamida Lote N° 1018, Lorazepam Control N° 180010, Clorhidrato de Metoclopramida Control N° 179006, Clorhidrato de Nafazolina Control N° 185024, Naproxeno Control N° 100042, Nifedipina Control N° 189030, Nimodipino Control N° 108002, Norfloxacin Lote N° 1014, Clorhidrato de Pseudoefedrina Control N° 111007, Sulbactám Sódico Control N° 111006, Teofilina Control N° 191033, Tioconazol Control N° 109003, Trimetoprima Control N° 180012.

Para la evaluación de la información relevada se tuvieron en cuenta, en todos los casos, los datos obtenidos en el análisis realizado al lote de la SR en cuestión al momento de su establecimiento y el último análisis realizado.

Los valores de los parámetros evaluados se obtuvieron por utilización de metodologías de análisis codificadas en la Farmacopea Argentina y en otras bibliografías internacionalmente reconocidas, tales como Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) y Farmacopea Europea (EP, por sus siglas en inglés).

Las SR mencionadas en el presente trabajo fueron fraccionadas en condiciones de penumbra, bajo valores de temperatura y humedad controlada (entre 20 y 22 °C y a una humedad relativa menor al 10 %) y acondicionadas en frascos ampolla de vidrio neutro color caramelo, con tapón de bromobutilo y precinto de aluminio ajustado de manera tal que no gire sobre el tapón.

Todas estas sustancias fueron conservadas en las condiciones consignadas en su correspondiente Informe Técnico, cámara de frío a 5 °C ± 3 °C, bajo condiciones de buenas prácticas de laboratorio desde el momento de su establecimiento hasta el presente, excepto para el caso de Sulbactam Sódico cuya temperatura de conservación fue alrededor de - 20°C.

RESULTADOS

En la **Tabla 1** se muestran los valores de humedad y contenido de agua obtenidos del análisis de diez SR al momento de su establecimiento y en el último estudio de estabilidad realizado (entre paréntesis se indica el año correspondiente).

En la **Tabla 2** se pueden observar los resultados de las valoraciones potenciométricas de diez SR analizadas al momento de su establecimiento y en el último ensayo de estabilidad (entre paréntesis se indica el año correspondiente).

En la **Tabla 3** se indican los datos de pureza obtenidos, por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés), de siete SR analizadas al momento de su establecimiento y en el último control de estabilidad (entre paréntesis se indica el año correspondiente).

En la **Tabla 4** se muestra el porcentaje de impurezas presentes de diez SR analizadas al momento de su establecimiento y en el último control de estabilidad (entre paréntesis se indica el año correspondiente).

En la **Figura 1** se indica, sobre un total de 102 SR establecidas, los porcentajes de Hojas de Información Técnica que debieron ser modificadas luego de algún ensayo de estabilidad.

TABLA 1: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AGUA O PORCENTAJE DE PÉRDIDA POR SECADO.

Sustancia	Metodología	Establecimiento	Último control
Metoclopramida, Clorhidrato de	Coulombimetría	5,13 % (1979)	4,98 % (2018)
Betametasona	Coulombimetría	0,15 % (1989)	0,21 % (2017)
Dextropropoxifeno, Clorhidrato de	Coulombimetría	0,04% (2010)	0,04% (2015)
Teofilina	Coulombimetría	0,32 % (1991)	0,41 % (2017)
Lorazepam	Coulombimetría	0,07 % (1994)	0,09 % (2015)
Pseudoefedrina, Clorhidrato de	Pérdida por secado	0,03 % (2011)	0,00 % (2017)
Trimetoprima	Pérdida por secado	0,02 % (1980)	0,00 % (2018)
Dextrometofán, Bromhidrato de	Coulombimetría	4,95 % (1983)	4,90 % (2010)
Atenolol	Coulombimetría	0,39 % (1990)	0,53 % (2014)
Ciprofloxacino, Clorhidrato de	Coulombimetría	6,30 % (2002)	6,30 % (2019)

TABLA 2: VALORACIÓN DE SUSTANCIAS POR POTENCIOMETRÍA.

Referencias: SSA: sobre sustancia anhidra. SSTC: sobre sustancia tal cual. SSS: sobre sustancia secada.

Sustancia	Establecimiento	Último control
Metoclopramida, Clorhidrato de	100,2 % SSA (1979)	101,4 % SSA (2018)
Dextropropoxifeno, Clorhidrato de	100,2 % SSS (1979)	100,3 % SSA (2018)
Clordiazepóxido	99,9 % SSS (1981)	100,2 % SSA (2018)
Dextrometorfán, Bromhidrato de	100,0 % SSA (1983)	99,9 % SSA (2010)
Teofilina	99,3 % SSA (1991)	99,3 % SSA (2003)
Clorfeniramina, Maleato de	100,0 % SSS (1981)	100,0 % SSS (2018)
Impureza de Sulbactam, 6-APA	97,2 % SSTC (2011)	97,6 % SSTC (2017)
Trimetoprima	100,1 % SSS (1980)	100,0 % SSS (2018)
Norfloxacina	99,6 % SSTC (2012)	99,7 % SSTC (2019)
Enalapril, Maleato de	99,8 % SSTC (2010)	100,0 % SSTC (2019)

TABLA 3: ESTIMACIÓN DE LA PUREZA CRISTALINA EN MOLES % POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.

Sustancia	Establecimiento	Último control
Dextropropoxifeno, Clorhidrato de	99,77 % (2010)	99,76 % (2016)
Trimetoprima	99,97 % (2000)	99,99 % (2015)
Difenhidramina, Clorhidrato de	99,77 % (2006)	99,88 % (2016)
Nafazolina, Clorhidrato de	99,15 % (1986)	99,35 % (2016)
Nifedipina	99,99 % (2005)	99,98 % (2015)
Atenolol	99,84 % (1990)	99,94 % (2019)
Fenobarbital	99,67 % (2012)	99,85 % (2019)

TABLA 4: ESTIMACIÓN DE IMPUREZAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC).

Sustancia	Establecimiento	Último control
Ciprofloxacina, Clorhidrato de	0,12 % (2002)	0,14 % (2018)
Teofilina	0,05 % (1991)	0,01 % (2019)
Naproxeno	0,03 % (2000)	0,03 % (2010)
Ciprofloxacino, Clorhidrato de	0,12 % (2002)	0,14 % (2019)
Amiodarona, Clorhidrato de	0,14 % (2000)	0,18 % (2019)
Enalapril, Maleato de	0,28 % (2000)	0,33 % (2010)
Nimodipino	0,21 % (2000)	0,15 % (2010)
Tioconazol	0,36 % (2009)	0,41 % (2019)
Sulbactam sódico	0,08 % (2011)	0,18 % (2019)
Glibenclamida	0,29 % (2000)	0,26 % (2010)

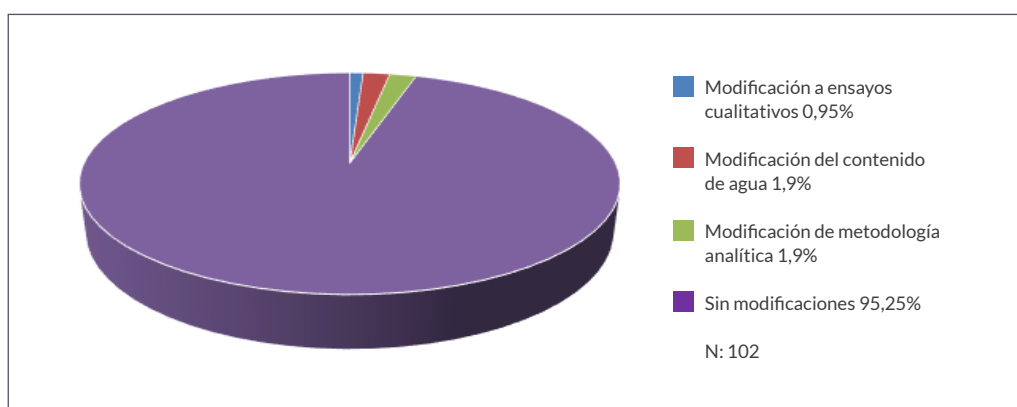


FIGURA 1. RELEVAMIENTO DE CAMBIOS EN LAS HOJAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA.

DISCUSIÓN

Mediante el seguimiento de estabilidad de las SR, el cual se realiza desde su establecimiento hasta su baja o agotamiento a una frecuencia establecida, se verifica la calidad y perfil de pureza. En los casos mencionados en esta revisión, no se evidenciaron variaciones que impacten en la calidad de los atributos fisicoquímicos que puedan llevar al descarte del material. Esto podría atribuirse al control de los parámetros ambientales durante la etapa de fraccionamiento, como así también en su posterior conservación. Factores ambientales como la humedad, temperatura y exposición a la luz podrían actuar como catalizadores de reacciones de degradación.

Realizar controles periódicos y búsqueda de indicios de degradación en las SR, tal como se ejemplifican en los casos mencionados en este artículo, permite asegurar su calidad evitando un descarte innecesario del material que permanece en buenas condiciones y, por lo tanto, optimizar recursos humanos, materiales e insumos.

Según la OMS, todas las SR preparadas en el laboratorio deben ser re-analizadas a intervalos regulares para asegurar que no ha ocurrido deterioro. Este intervalo de re-análisis dependerá de un número de factores, incluyendo estabilidad de la sustancia, condiciones de almacenamiento empleadas, tipo de envase y grado de uso (con qué frecuencia se abre y cierra el envase). En el caso de que los resultados del re-análisis de una SR no cumplieran con las especificaciones, se deberá llevar a cabo una revisión retrospectiva de los ensayos realizados usando dicha SR desde la última evaluación de la misma, y debiéndose aplicar análisis de riesgo para la evaluación de los resultados de la revisión retrospectiva y la consideración de posibles acciones correctivas^[7]. Por otro lado, las SR farmacopeicas son regularmente re-analizadas y su validez (estado actual) puede ser consultada en la farmacopea que las provee, por varios medios, ej. sitios web o catálogos. El re-análisis por el laboratorio no es necesario, siempre y cuando las SR se almacenen de acuerdo con las condiciones indicadas.

Para el caso de las SR establecidas bajo la responsabilidad de ANMAT-INAME y Farmacopea Argentina, cuando se detecta alguna modificación significativa que altera sus propiedades, la sustancia en cuestión es dada de baja. Cuando la modificación detectada en su atributo no es significativa, su Hoja de Información Técnica (HIT) es actualizada detallando los nuevos valores como, por ejemplo, en el caso de la SR Atenolol mencionada, donde el contenido de agua pasó de 0,39 % a 0,53 % (**Tabla 1**). La definición de lo que se supone una variación significativa o de importancia difiere según el uso al que se destine la SR. Una modificación en el porcentaje de impurezas puede no afectar la utilidad del material para pruebas de identificación, pero puede resultar inadmisiblesi se utiliza en ensayos cromatográficos cuantitativos.

Comparando con otras agencias y organizaciones, en el caso de las que son provistas por la OMS, su estabilidad es controlada a través de exámenes periódicos llevados a cabo por dicho organismo internacional, y todo material que se haya deteriorado es reemplazado por un nuevo lote^[8].

La correcta conservación de las SR resulta, además, una variable crítica para poder garantizar su calidad. Tanto la Farmacopea Europea como la Farmacopea de los Estados Unidos consignan en el rótulo la conservación de los estándares que distribuyen, y hacen responsable al usuario de cumplir con este requisito para asegurar la calidad del material^[9,10]. La Farmacopea Argentina detalla la forma de conservación de sus SR en la HIT que se distribuye junto al material o que se encuentra disponible para su consulta en la página web de ANMAT.

CONCLUSIÓN

El presente análisis retrospectivo de los resultados de los ensayos realizados sobre distintas SR permite observar que, a lo largo del tiempo, no se detectaron alteraciones significativas que puedan impactar negativamente en el título asignado y en su uso como referencia, demostrando que no es necesario la asignación de una fecha arbitraria de caducidad de las sustancias establecidas, mientras se realice un seguimiento de estabilidad. Por lo expuesto, se podría concluir que, asegurando las adecuadas condiciones de conservación, las SR permanecerían confiables y estables logrando así mantener su calidad por períodos prolongados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 3. General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances. WHO technical report series; no. 943. 2007.
- 2- Disposición ANMAT 3827/2018. Guía de Buenas Prácticas de Fabricación para elaboradores, importadores/exportadores de medicamentos para uso humano. Capítulo 6. Control de Calidad. Argentina: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica; 2018.
- 3- World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 3. Introduction. 35° report. WHO technical report series; no. 885. 2007.
- 4- World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 3. Assessment of need for the establishment of chemical reference substances. 35° report. WHO technical report series; no. 885. 2007.
- 5- Disposición ANMAT 6781/2019. Farmacopea Argentina 7 Edición. Primer suplemento. Consideraciones generales. Argentina: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica; 2019.
- 6- World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 3. Stability. 35° report. WHO technical report series; no. 885.; 2007.
- 7- World Health Organization. WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories. Annex 1. WHO technical report series; no. 957. 2010.
- 8- World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 1. WHO technical report series; no. 885. 2007.
- 9- United States Pharmacopeial and National Formulary (USP 42 – NF 37). <11> USP Reference Standards. 2020.
- 10- European Pharmacopoeia 10th edition (EP 10.0). 5.12 Reference Standards. 2020.

IMPACTO DE LA IMPLEMENTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CHECKLIST, TRAZABILIDAD EN TIEMPO REAL Y COMUNICACIÓN CON EL PACIENTE (HELIOS-CHECK) EN LA ADHERENCIA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN DIFERENTES PROVINCIAS DE ARGENTINA

The impact of the checklist implementation, real-time traceability and patient communication strategy (HELIOS-TEST) on the adherence to antiretroviral therapy in different provinces of Argentina

Yanina Sarnagiotto^a, Diego M. Cecchini^b, Jamile Ballivian^c, Alejandra Gonzalez^a, Hugo Visciglio^{a,b}, Isabel Cassetti^b

^a Helios Pharma S.A. ^b Helios Salud S.A. ^c Fundación Helios Salud. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: ysarnagiotto@heliospharma.com.ar

Recibido: 10 de diciembre de 2019. Aprobado: 25 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El acceso al tratamiento antirretroviral (TARV) es una de las bases fundamentales para el control de la epidemia de VIH/SIDA a nivel local, regional y mundial. Esto se enmarca en los objetivos estratégicos "90-90-90" propuestos para el año 2020. Teniendo en cuenta que los equipos de farmacia cumplen un rol clave en la provisión en tiempo y forma del TARV bajo estrictas normas de trazabilidad y controles de calidad, se desarrolló un programa para la dispensación y monitoreo de adherencia al mismo (HELIOS-CHECK). El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la implementación de esta estrategia por una droguería (Helios Pharma) en la adherencia al TARV en pacientes con cobertura de salud del interior del país. Se realizó un estudio analítico retrospectivo en el que se incluyeron todos los pacientes en seguimiento en el interior del país con prescripción para este tipo de tratamiento antiviral desde el año 2015 a 2018 inclusive (sistema InfHos). Se evaluó la proporción de adherencia definido por retiros de farmacia y la supresión viral en 2016 y 2018, antes y después de la implementación de la estrategia en 2017. Se aplicó la prueba de Z para diferencia de proporciones y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se detectó en 2016 una adherencia del 86.7% ($n=2030$) y del 98% ($n=2907$) en 2018, con un incremento significativo del 10.3% tras la implementación de HELIOS-CHECK en 2017 ($p < 0.001$; IC 95%: 9.65%- 12.86%). Con respecto a la supresión viral, la proporción de pacientes con carga viral indetectable en 2016 fue del 77% y del 87% en 2018, correspondiendo a un incremento del 10% ($p < 0.001$; IC 95% 8-12%). Esta estrategia presentó un impacto significativo en la adherencia al TARV y la supresión viral.

Palabras clave: VIH, adherencia, tratamiento antirretroviral, trazabilidad, procedimiento HELIOS-CHECK.

ABSTRACT

Access to antiretroviral treatment (ART) is one of the fundamental basis for the control of the HIV/AIDS epidemic at local, regional and global levels. This is part of the strategic "90-90-90" objectives proposed for the year 2020. To achieve these goals, pharmacy teams play a key role in the timely provision of ART under strict traceability standards and quality controls. Considering this need, we have developed a program for dispensing and monitoring its adherence (HELIOS-TEST). The objective of this study was to evaluate the implementation and impact of this strategy made by a national drugstore (Helios Pharma SA.) on the adherence to this treatment in patients with health coverage that reside in the interior of the country. For this purpose, a retrospective analytical study was performed including all the patients with prescription of ART from the year 2015 to 2018 inclusive (InfHos system). The proportion of adherence, defined by pharmacy withdrawals and viral suppression, was evaluated before (2016) and after (2018) the implementation of the mentioned strategy in 2017. The Z test was applied to evaluate differences in proportions and a value of $p < 0.05$ was considered significant. In 2016, adherence was at 86.7% ($n = 2030$), while in 2018, it was detected at 98% ($n = 2907$), with a significant increase of 10.3% after the implementation of HELIOS-TEST ($p < 0.001$; 95% CI: 9.65% - 12.86%). With respect to viral suppression, the proportion of patients with undetectable viral load was 77% in 2016 and 87% in 2018, corresponding to an increase of 10% ($p < 0.001$; 95% CI 8-12%). This strategy had a significant impact on the adherence to ART and virologic suppression.

Keywords: HIV, adherence, antiretroviral treatment, traceability, HELIOS-TEST procedure.

INTRODUCCIÓN

El advenimiento del Tratamiento Antirretroviral de alta eficacia (TARV) marcó un cambio en el pronóstico de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), produciendo un marcado descenso en la morbilidad y mortalidad^[1,2]. En la actualidad, se dispone de más de 20 drogas en el mercado, pasibles de ser combinadas o, algunas de ellas, disponibles en coformulación. Esto trajo como consecuencia, en forma paralela al aumento de la sobrevida, una mejora en la calidad de vida de los pacientes y facilitó la adherencia al tratamiento mediante posologías menos complejas que las que existían hace unos años. Asimismo, constituye una valiosa estrategia para la prevención de la transmisión vertical y horizontal del VIH^[3].

El acceso al TARV es uno de los pilares fundamentales para el control de la epidemia de VIH/SIDA a nivel local, regional y mundial^[4]. Esto se encuadra en los objetivos estratégicos “90-90-90” propuestos como programa por la Organización de las Naciones Unidas, ONUSIDA, para el año 2020^[5] a saber:

- Que el 90% de las personas que viven con el VIH conozcan su estado serológico respecto al VIH.
- Que el 90% de las personas diagnosticadas con el VIH reciban TARV de manera continuada.
- Que el 90% de las personas que reciben TARV tengan supresión viral.

Se estima que, cuando se alcance este triple objetivo, al menos el 73% de las personas que viven con el VIH en todo el mundo tendrá supresión viral; un número de dos a tres veces mayor que las estimaciones actuales. Esto requerirá un acceso ininterrumpido a un tratamiento de por vida para decenas de millones de personas, además de sistemas sanitarios y comunitarios fuertes y flexibles, programas de protección y promoción de los derechos humanos y mecanismos de autofinanciación capaces de costear programas de tratamiento de por vida.

Considerando las dos últimas metas de los objetivos “90-90-90”, los equipos de farmacia cumplen un rol clave en cuanto a proveer en tiempo y forma el TARV bajo estrictas normas de trazabilidad y controles de calidad^[6]. Sin embargo, en Argentina existen diferencias muy marcadas en el acceso a los servicios de salud según el lugar de residencia de la población. Se observa una mayor disponibilidad en los centros urbanos, mientras que en el interior del país los servicios son segmentados, heterogéneos y poco equitativos, sumado al estigma y la discriminación como conducta social^[1].

Dentro de las dificultades más frecuentes para acceder a la medicación se encontraron las distancias, limitación en las redes de distribución, falta de comunicación con su prestador de salud, horarios de atención, manejo de la confidencialidad, desconocimiento sobre la patología, falta de apoyo social y familiar, entre otros^[7,8].

En este contexto, la implementación de estrategias para monitorear la dispensación de farmacia permite realizar intervenciones con los pacientes, de manera que faciliten su

adherencia al tratamiento. Teniendo en cuenta esta necesidad, se desarrolló un programa orientado a todos los profesionales farmacéuticos y sus colaboradores que se desempeñan en nuestra red de farmacias en relación a la dispensación y monitoreo de adherencia al TARV (HELIOS-CHECK). Este programa tiene como objetivo optimizar la adherencia a los retiros de medicación antirretroviral en las farmacias del interior del país. Esto requirió de las firmas de acuerdos técnicos y de compromiso entre las droguerías y las farmacias correspondientes. Brevemente, la estrategia HELIOS-CHECK consiste en tres pilares (**Figura 1**) a saber^[9-16]:

1- Checklist: Se desarrolló un sistema informático, Webservice InfHos®, que permite identificar información específica y completa del flujo de la medicación que se distribuye desde la droguería (Ciudad de Buenos Aires, CABA) a toda la Red de Farmacias del interior del país, lo que permite recolectar los datos requeridos para asegurar el seguimiento de la adherencia al retiro del tratamiento. Esta herramienta ha sido certificada y recertificada con GS1 (Global Standard 1) y la legislación vigente en materia de Buenas Prácticas de Almacenamiento, Distribución, Transporte y Trazabilidad, la cual incluye estándares para la identificación de todas las unidades distribuidas (SSCC, Código Seriado de Contenedor de Empaque).

2- Trazabilidad en tiempo real: Con el Webservice InfHos®, se realiza la supervisión del cumplimiento de la trazabilidad, recibiendo información del envío, llegada y dispensa de la medicación a las farmacias del interior del país. Para evitar que los pacientes queden desabastecidos de medicación, se realiza el envío desde CABA con 15 días de anticipación a la fecha esperada de retiro. El formato de envío de la medicación se denomina Pharmabox, que consiste en una caja que contiene todas las medicaciones requeridas por el paciente. Cada Pharmabox, presenta un código único de identificación SSCC que corresponde a un único paciente.

3- Comunicación con el paciente: En el contexto del *checklist* y los controles de trazabilidad, se desarrollan en paralelo acciones de comunicación con el paciente vía correo electrónico, mensaje de texto (SMS) y servicios de mensajería instantánea móvil. Se envían notificaciones informando la salida de la medicación de droguería a su farmacia de referencia (evento 39 SNT, Sistema Nacional de Trazabilidad) y que la medicación se encuentra disponible en la farmacia para su retiro (evento 101 SNT). Este último mensaje se reitera a los 10 días en caso de que el paciente no haya retirado la medicación, y en caso de persistir la situación de no retiro, el equipo de adherencia de la droguería realiza llamadas personalizadas al paciente. Estas comunicaciones tienen como objetivo abordar los inconvenientes o situaciones que demoraron el retiro del tratamiento y acordar con el paciente una nueva fecha de dispensa.

Nuestro objetivo fue evaluar el impacto de la implementación de esta estrategia por la droguería Helios Pharma SA. en la adherencia al TARV en pacientes con cobertura de salud del interior del país.



FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO PROCEDIMIENTO HELIOS-CHECK PARA DISPENSACIÓN DE MEDICACIÓN ANTIRRETROVIRAL A PACIENTES DEL INTERIOR DEL PAÍS.
SNT: Sistema Nacional de Trazabilidad

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio analítico retrospectivo en el que se incluyeron todos los pacientes en seguimiento por Helios Pharma SA. en el interior del país con prescripción de TARV desde el año 2015 a 2018 inclusive.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con diagnóstico confirmado de VIH.
- Tener prescripción médica para tratamiento antirretroviral entre el año 2015 y 2018 inclusive.
- Cobertura médica de las obras sociales y empresas de medicina prepaga en convenio con Helios Salud SA.
- Residir en el interior del país.
- Tener asignada una de las farmacias de la red de Helios Pharma SA. perteneciente al interior de país.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Suspensión de tratamiento por indicación médica
- Pacientes sin residencia en interior del país

- Falta de cobertura médica de las obras sociales y empresas de medicina prepaga en convenio con Helios Salud SA.
- Pacientes enrolados en ensayos clínicos

Todos los pacientes que cumplieran los criterios previos fueron identificados en la base de datos de Helios Pharma SA., sin exclusión por sexo o edad a través del sistema InfHos^(R). Este sistema es una herramienta Webservice de desarrollo propio (<http://www.infhos.com.ar/>), la misma es muy amigable y de fácil acceso para el usuario e incluye alertas para garantizar las dispensas al paciente correcto. Esta herramienta ha sido certificada y re certificada por GS1 con el fin de validarla^[16]. En la **Tabla 1** y **Figura 2** se presenta la distribución de pacientes en el interior del país.

Se evaluó la proporción de adherencia (definida por retiros de farmacias) y supresión viral antes (período 2016) y después (período 2018) de la implementación de la estrategia HELIOS-CHECK en 2017. Se aplicó la prueba de Z para diferencia de

proporciones y se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Análisis de los datos

Las variables categóricas se describieron utilizando frecuencias absolutas y relativas y se compararon mediante la prueba Z para diferencia de proporciones. Todas las pruebas fueron de dos lados y se consideraron significativas si el valor p era menor a 0.05. Los análisis se realizaron con el *software* R versión 3.5.0.

RESULTADOS

El cumplimiento en el retiro de medicación en el período comprendido entre los años 2015 y 2018 se detalla en la **Tabla 2**. Se documentó un incremento significativo del 10.3% ($p < 0.001$; IC 95%: 9.65%- 12.86%) en el nivel de adherencia tras la implementación de la estrategia HELIOS-CHECK en 2017.

Estratificación por sexo

De los pacientes en seguimiento en 2016 el 72.9% (IC95%: 70.9-74.8) corresponde a sujetos de sexo masculino ($n=1480$) y 27.1% (IC 95% 25.2-29.1; $n=550$) de sexo femenino. La proporción de

adherencia considerando los retiros de farmacia entre usuarios hombres fue del 87.9% (IC95% 86.1- 89.5; $n=1301$) y del 83.6% (IC95% 80.3-86.6; $n=460$) entre usuarias mujeres en dicho año. Tras la implementación de la estrategia, se detectó un incremento en el nivel de adherencia tras la estratificación por sexo (**Figuras 3 y 4**).

Entre los usuarios de sexo masculino se detectó un incremento significativo en la adherencia luego de la implementación de HELIOS-CHECK del 10.3% ($P < 0.001$; IC95% 8.48-12.1). Se evidenció también un incremento significativo del 13.8% en el caso de las mujeres ($p < 0.001$; IC95% 10.3-17.3).

Supresión Viral

Se evaluó también el nivel de supresión viral entre los pacientes en seguimiento con HELIOS-CHECK. La proporción de pacientes con carga viral indetectable en 2016 fue del 77% y del 87% en 2018. Nuevamente se detectó un incremento significativo del 10% en la proporción de pacientes con carga viral indetectable ($p < 0.001$; IC 95% 8-12%).

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES EN EL INTERIOR DEL PAÍS (PERÍODO 2015-2018) POR PROVINCIA.

Provincias	2015	2016	2017	2018
Buenos Aires	276	411	528	624
Catamarca	1	1	1	3
Chaco	27	33	37	43
Chubut	71	89	97	118
Córdoba	279	394	591	599
Corrientes	50	48	53	60
Entre Ríos	59	70	82	134
Formosa	8	9	8	11
Jujuy	25	38	44	44
La Pampa	20	17	22	21
La Rioja	14	12	15	23
Mendoza	99	154	169	218
Misiones	22	29	27	35
Neuquén	59	81	85	99
Río Negro	67	84	82	98
Salta	44	78	92	149
San Juan	12	26	29	33
San Luis	11	16	24	32
Santa Cruz	27	32	39	58
Santa Fe	325	326	350	375
Santiago del Estero	6	8	13	11
Tierra del Fuego	36	37	39	44
Tucumán	30	37	53	75
TOTAL	1568	2030	2480	2907

TABLA 2. PROPORCIÓN DE PACIENTES ADHERENTES AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL
(MEDIDO POR DISPENSACIÓN DE FARMACIA) EN EL INTERIOR DEL PAÍS (PERÍODO 2015-2018).

AÑO	Total Pacientes	ADHERENTES		NO ADHERENTES	
		CANTIDAD	% (IC)	CANTIDAD	% (IC)
2015	1568	1343	85.7 (83.8- 87.3)	225	14.3(12.7-16.2)
2016	2030	1761	86.7 (85.2-88.2)	269	13.3(11.8-14.8)
2017	2480	2278	91.9 (90.7- 92.9)	202	8.1 (7.1-9.3)
2018	2907	2849	98 (97.4- 98.5)	58	2.0 (1.52-2.57)

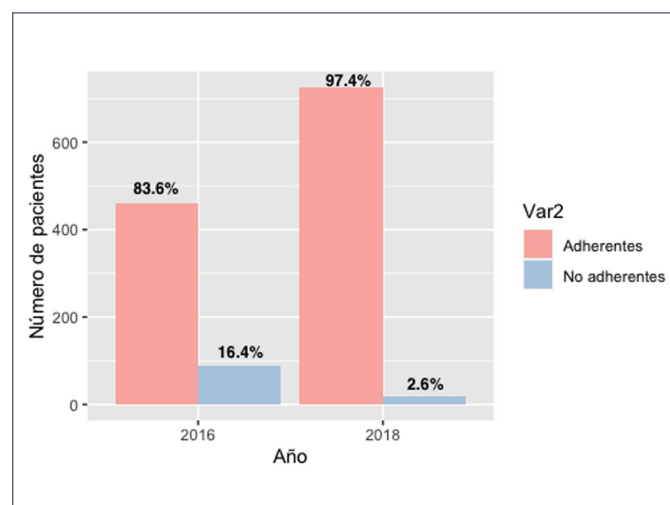


FIGURA 3. NIVEL DE ADHERENCIA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (RETIRO DE FARMACIA) EN MUJERES ANTES Y LUEGO DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA HELIOS-CHECK.

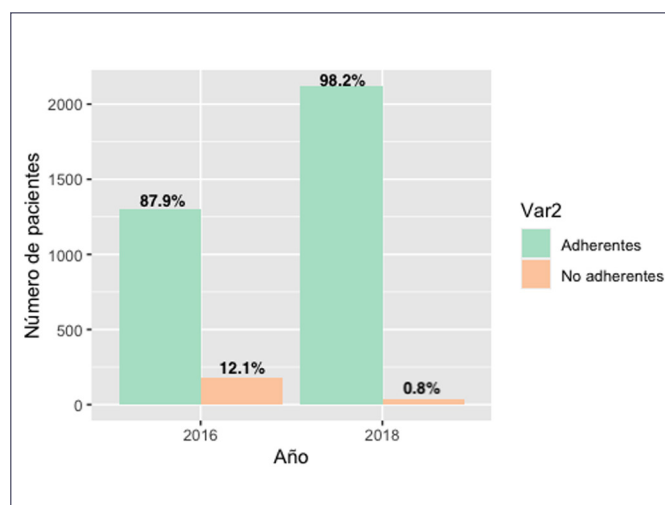


FIGURA 4. NIVEL DE ADHERENCIA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (RETIRO DE FARMACIA) EN HOMBRES ANTES Y LUEGO DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA HELIOS-CHECK.

DISCUSIÓN

Este estudio constituye la primera experiencia a nivel nacional mostrando el impacto de una estrategia farmacéutica en la adherencia a los retiros de tratamiento antirretroviral en el interior de Argentina. Conocer en tiempo real el estado del envío de la medicación, aplicando y cumpliendo la normativa vigente en materia de trazabilidad, es fundamental para el adecuado seguimiento de los pacientes con patologías crónicas.

La aplicación de la intervención HELIOS-CHECK, mostró un impacto estadísticamente significativo en el retiro de la medicación antirretroviral, lo cual permite un mejor recupero de los módulos según la normativa vigente por la Superintendencia de Servicios de Salud para las drogas correspondientes a patologías de baja frecuencia y alto costo. Esto resulta de alta importancia en el sostenimiento a largo plazo de las instituciones de salud que se rigen bajo esta normativa^[17,18] y permite evaluar la adherencia en forma continua analizando las demoras según las fechas de retiro.

Sin embargo, las implicancias de esta estrategia trascienden aspectos administrativos, teniendo profundas consecuencias de salud pública. Considerando los objetivos estratégicos propuestos por ONUSIDA para el año 2020^[5], garantizar y facilitar el acceso al TARV es clave en función de lograr el segundo "90" (que 90% de las personas diagnosticadas con el VIH reciban

TARV de manera continuada) de este plan. El interior del país presenta segmentación y heterogeneidad en sus sistemas de salud, lo que se traduce en barreras estructurales que dificultan el acceso a la medicación^[1]. A esto se suma que los pacientes pueden requerir trasladarse distancias considerables desde su domicilio al centro urbano donde se realiza la dispensación de la misma^[8]. En este contexto, la estrategia HELIOS-CHECK permite tener al paciente perfectamente informado del estado del pedido de su medicación antirretroviral mensual, sabiendo de antemano cuándo está disponible y evitando de este modo traslados innecesarios. Esto permitiría generar estabilidad en los retiros y confianza y empoderamiento en el paciente, mejorando su compromiso para con su tratamiento y su vínculo con su prestador de salud.

Esto repercutiría directamente en el tercer "90" (90% de las personas que reciben TARV tengan supresión viral)^[5], optimizando la proporción de pacientes con carga viral indetectable. Con la implementación de la estrategia HELIOS-CHECK, se observó un incremento de 10% en la supresión viral, ascendiendo del 77 al 87%, lo cual implica no sólo una mejoría en la adherencia considerando los retiros, sino también considerando la proporción de pacientes con indetectabilidad, lo cual muestra que los mismos tomaron su medicación correctamente además de retirarla de la farmacia. Esto tiene profundas implicancias de

salud pública en cuanto a que la supresión viral no sólo permite a los pacientes lograr la reconstitución inmunológica preservando su salud y permitiéndoles una excelente calidad y expectativa de vida^[2], sino que también contribuye al control de la epidemia de HIV/SIDA en base a la evidencia de que los pacientes con supresión viral no transmiten el virus por vía sexual y perinatal ("indetectable = intransmisible")^[3].

Considerando que las farmacias son los efectores de salud más numerosos y de fácil acceso para el público, una adecuada articulación con la droguería proveedora, teniendo en cuenta los circuitos de trazabilidad y la normativa vigente, resulta de fundamental importancia para garantizar el acceso oportuno al tratamiento en pacientes con patologías crónicas. En este contexto, la estrategia HELIOS-CHECK podría constituir una herramienta superadora en la provisión de tratamiento y monitoreo de la adherencia de personas que viven con HIV/SIDA en el interior de país, con el potencial de ser aplicable también en otras patologías de alto costo y baja prevalencia.

Agradecimientos

Al Lic. Luciano Fresia, Helios Salud, SA.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Respuesta Al VIH, Sida e Infecciones de Transmisión Sexual: Plan Estratégico Nacional 2018-2021 [internet]. Argentina: Dirección de Sida, ETS, Hepatitis y TBC, Secretaría de Gobierno de Salud, Ministerio de Salud y Desarrollo Social Argentina; 2018 [actualizado 01 enero 2019; citado 18 de agosto de 2020]. Disponible en http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001399cnt-2019-01_respuesta-vih-sida-infecciones-transmision-sexual.pdf
- 2- Palella FJ, Deloria-Knoll M, Chmiel JS, Moorman AC, Wood KC, Greenberg A et al. Survival Benefit of Initiating Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Persons in Different CD4+ Cell Strata. *Ann Intern Med*. 2003;138(8): 620-626.
- 3- The Lancet HIV. U=U taking off in 2017. *Lancet HIV*. 2017;4(11):e4754.
- 4- INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015;373(9):795-807.
- 5- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 90-90-90: An Ambitious Treatment Target to Help End the AIDS Epidemic [internet]. Geneva: UNAIDS; 2014. [actualizado a 01 octubre 2014; citado 19 agosto 2020]. Disponible en: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en.pdf
- 6- Ma A, Chen DM, Chau FM, Saberi P. Improving adherence and clinical outcomes through an HIV pharmacist's interventions. *AIDS Care*. 2010;22(10):1189-1194.
- 7- Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Vivir En Positivo: Guía Para Las Personas Con VIH, Sus Familiares y Amigos [internet]. Argentina: Dirección de Sida y ETS, Ministerio de Salud de la Nación; 2016 [actualizado 01 enero 2016; citado 19 de agosto de 2020]. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/ryc/graficos/0000000859cnt-2016-07_guia-vivir-en-positivo-personas-vih-familiares-amigos.pdf
- 8- Shubber Z, Mills EJ, Nachega JB, Vreeman R, Freitas M, Bock P, et al. Patient-Reported Barriers to Adherence to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2016;13(11):e1002183.
- 9- Ministerio de Salud. ESPECIALIDADES MEDICINALES Resolución 435/2011 [internet]. Argentina: ANMAT; 2011 [actualizado 05 abril 2011; citado 19 agosto 2020]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Resolucion_435-2011.pdf
- 10- Ministerio de Salud. Trazabilidad de Medicamentos. Disposición 3683/11 [internet]. Argentina: ANMAT; 2011 [actualizado 23 mayo 2011; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/mayo_2011/Dispo_3683-11.pdf
- 11- Ministerio de Salud. Trazabilidad de Medicamentos. Disposición 1831 [internet]. Argentina: ANMAT; 2012 [actualizado 28 marzo 2012; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: http://www.colfarnn.org.ar/2014/datos/institucional/legal/30_3_Dispo_1831-12.pdf
- 12- Ministerio de Salud. Trazabilidad de Medicamentos. Disposición 0247/13 [internet]. Argentina: ANMAT; 2013 [actualizado 15 de enero de 2013; citado 21 de agosto de 2020]. Disponible en: http://www.colfarnn.org.ar/2014/datos/institucional/legal/30_4_Dispo_0247-13.pdf
- 13- Ministerio de Salud. Trazabilidad de Medicamentos. Disposición 0963/15 [internet]. Argentina: ANMAT; 2015 [actualizado 26 enero 2015; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: http://www.colfarnn.org.ar/2014/datos/institucional/legal/30_5_Dispo_0963-15.pdf
- 14- El lenguaje mundial de los negocios [internet]. Argentina: GS1 Argentina AISBL; 2020 [actualizado 21 agosto 2020; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.gs1.org.ar/Site/index.html>
- 15- Ministerio de Salud. ANMAT. Buenas Prácticas de Trazabilidad de Medicamentos. Versión 2.0. Argentina: ANMAT; 2015 [actualizado 18 febrero 2015; citado 21 de agosto 2020]. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/trazabilidad/docs/Manual_BPT_v1_0_\(2015-02-18\).pdf](http://www.anmat.gov.ar/trazabilidad/docs/Manual_BPT_v1_0_(2015-02-18).pdf)
- 16- GS1 Argentina. Estándar Mundial de Trazabilidad en el Sector Salud (GTSH) Guía de Implementación [internet]. Versión 1. Argentina: GS1 Argentina; 2009 [actualizado 1 abril 2009; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.gs1.org.ar/documentos/GUIA%20IMPLEMENTACION%20GTSH.pdf>
- 17- Organización Panamericana de la Salud. Marco de monitoreo de los servicios relacionados con el VIH y las ITS para grupos de población clave en América Latina y el Caribe [internet]. Versión 1. Washington, D.C.: OPS; 2019 [actualizado 2019; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51681>
- 18- Ministerio de Salud. Superintendencia de Servicios de Salud. Resolución No 1048/2014 [internet]. Argentina: Superintendencia de Servicios de Salud; 2014 [actualizado 13 junio 2014; citado 21 agosto 2020]. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/230000-234999/231401/texact.htm>

GUÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA DISPOSICIÓN ANMAT N° 9943/19: ESPECIALIDADES MEDICINALES NANOFARMACÉUTICAS, DOXORRUBICINA LIPOSOMAL

Guidelines for the implementation of ANMAT Provision N° 9943/19: nanopharmaceutical products, liposomal doxorubicin

Yanina I. Rodriguez*, Ana Laura Canil*, Paola Carvalho*, María Victoria Cid*, Laura Cladouchos*, Verónica Llauro*, Ana Laura Rinaldi*, Nadia Villar*, Matías Gómez*.

Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, Instituto Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: yrodriguez@anmat.gov.ar

**Todos los autores contribuyeron equitativamente al desarrollo de este trabajo.*

Recibido: 9 de noviembre de 2020. Aprobado: 27 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El uso de liposomas como sistemas de administración de fármacos ha visto un gran desarrollo en las últimas décadas. En el caso particular de la doxorubicina, su encapsulación dentro de estas vesículas lipídicas permite reducir sus efectos tóxicos manteniendo su eficacia terapéutica. Debido a su complejidad, cambios en el método de elaboración, en la composición o en la calidad de la materia prima del producto pueden conducir a variaciones considerables en las propiedades fisicoquímicas y en la eficacia de la formulación liposomal. Por lo tanto, la caracterización de estos productos requiere de una exhaustiva evaluación de sus parámetros fisicoquímicos, farmacotécnicos y microbiológicos, junto con la inclusión de ensayos preclínicos que permitan estudiar la farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad del producto. Es por tanto, el objetivo de este trabajo proveer una visión regulatoria acerca de las principales características que se deben evaluar para el registro de productos de doxorubicina liposomal nanosimilar.

Palabras clave: nanosimilar, sistemas de administración de fármacos, formulación liposomal, doxorubicina.

ABSTRACT

The use of liposomes as drug delivery systems has seen a great development in the last decades. In the particular case of doxorubicin, its encapsulation inside lipidic vesicles allows a reduction in its toxic effects while maintaining its therapeutic efficacy. Due to their complexity, changes in the elaboration method, in the composition, or in the quality of the raw materials of these products can lead to significant variations in the physicochemical properties and in the efficacy of the liposomal formulation. Therefore, the characterization of these products requires an exhaustive evaluation of their physicochemical, pharmacotechnical and microbiological parameters, including preclinical trials for the study of the products' pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity. Thus, the objective of this article is to provide a regulatory vision about the main characteristics that must be evaluated for the registry of liposomal doxorubicin nanosimilar products.

Keywords: nanosimilar, drug delivery systems, liposomal formulation, doxorubicin.

INTRODUCCIÓN

El avance en el campo de la nanotecnología ha tenido un gran impacto en diversas áreas tales como la industria alimentaria^[1], la industria textil^[2] y el desarrollo de dispositivos y sistemas de diagnóstico^[3,4]. En particular, en el campo de la medicina, diversos nanomateriales han sido investigados para su uso como sistemas de transporte y liberación de fármacos^[5-7]. Entre ellos, los liposomas han sido destacados debido a características como su biodegradabilidad y no toxicidad, su flexibilidad, su capacidad de transportar tanto sustancias hidrofílicas como lipofílicas, y su capacidad de proteger a la droga encapsulada, disminuyendo sus efectos adversos^[8].

Los liposomas se describen clásicamente como vesículas generadas artificialmente, compuestas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran uno o más compartimentos acuosos. Incluyen, hasta el momento, los liposomas monolamelares y multilamelares, los liposomas multivesiculares, los liposomas recubiertos de polímero^[9,10]. Debido a su tamaño, características estructurales y, principalmente, al comportamiento que presentan dichas partículas, los liposomas se definen como productos nanotecnológicos.

Las dispersiones liposomales difieren de las especialidades medicinales inyectables tradicionales, dado que las primeras poseen características de formulación y distribución particulares. Esto genera que concentraciones plasmáticas similares no se correlacionen con la eficacia terapéutica equivalente. Incluso en los casos de composición aparentemente idéntica, la variación en la producción y la tecnología de control de productos y procesos puede dar lugar a productos con diferente eficacia terapéutica^[11]. Por tales motivos, la caracterización completa, el estudio de la estabilidad y su farmacocinética (incluida la distribución tisular) de un nuevo producto liposomal es fundamental para establecer un uso seguro y eficaz.

Diferencias en los pasos del proceso de fabricación y la formulación pueden afectar sustancialmente la eficacia / seguridad debido a cambios en las interacciones específicas entre liposomas y células, el grado de retención del principio activo en el liposoma, así como el tiempo de circulación, el *clearance* y las características de distribución de los nanovehículos^[12]. Por lo antes expuesto, es de suma relevancia determinar y definir los pasos críticos en el proceso de elaboración y control de este tipo de productos^[13].

La investigación, desarrollo y regulación de estos sistemas definidos como Drogas Complejas No Biológicas (NBCD, por su sigla en inglés) representa un desafío y requiere una evaluación diferenciada de los productos sintéticos tradicionales. Dado que la normativa establecida para las especialidades medicinales tradicionales resulta insuficiente en cuanto a su capacidad de describir las características y propiedades moleculares microscópicas y fisicoquímicas de estos productos, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en el año 2019 publicó la Disposición ANMAT N° 9943/19 con el objetivo de brindar un marco regulatorio complementario para el registro de especialidades medicinales nanofarmacéuticas.

Desde nuestra perspectiva, como autoridad regulatoria, es deseable el desarrollo de este tipo de sistemas de administración de fármacos de forma tal de direccionar la droga hacia el tejido blanco, evitando procesos de degradación de los fármacos, mejorando la biodisponibilidad y biodistribución, y reduciendo la toxicidad. Por tal motivo, es nuestra intención acompañar, desde el ámbito regulatorio, a la industria en estos procesos de innovación. Así, desde la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo (DFyGR) de INAME-ANMAT, se viene trabajando activamente en la definición de los requerimientos regulatorios necesarios para el registro y fiscalización post-comercialización de productos nanosimilares de forma de asegurar la calidad, seguridad y eficacia de todas las especialidades medicinales que se registren ante esta Administración, así como la evaluación del impacto sanitario que esto conlleva.

Es importante destacar que, desde hace más de dos décadas, existen en el mercado local y mundial especialidades medicinales de características nanotecnológicas; aunque, en nuestro país, el interés por el registro de productos similares se está dando en los últimos años. En la actualidad, se encuentran en proceso de registro de especialidades medicinales un número creciente de productos con diversas plataformas de liberación nanoestructuradas.

Con el objetivo de clarificar y unificar criterios en relación a la evaluación de estos productos, se encuentra trabajando un grupo interdisciplinario que abordó el análisis conjunto de todos los expedientes de registro de producto en curso; tomando como base la Disposición ANMAT N° 9943/19 y en concordancia con las guías internacionales, se redactó un documento interno específico denominado ***“Documento para la evaluación de registro de Doxorrubicina Liposomal nanosimilar”***, el cual establece parámetros críticos, especificaciones y ensayos necesarios para cumplimentar con lo establecido por la disposición anteriormente mencionada.

El objetivo del presente trabajo fue describir detalladamente los actuales requerimientos regulatorios establecidos por la DFyGR de INAME para el registro de ***“Doxorrubicina Liposomal nanosimilar”***, de forma tal de poder clarificar y acelerar los procesos de evaluación y registro. Cabe aclarar que, debido a que se trata de un proceso altamente dinámico de generación de conocimientos, dicha guía se irá actualizando a medida que surja nueva evidencia científica de relevancia.

Para ello se realizó una amplia búsqueda bibliográfica incluyendo guías internacionales existentes a la fecha^[11,15-18], con el fin de obtener la mayor información científica disponible; se realizaron reuniones internas interdisciplinarias de frecuencia semanal, de forma tal de realizar una evaluación conjunta de cada uno de los puntos críticos y/o relevantes necesarios a tener en cuenta en el análisis de registro de especialidades medicinales liposomales; y se elaboró un documento guía, el cual tomó como base la disposición ANMAT previamente mencionada, para establecer lineamientos regulatorios para la evaluación de expedientes de registro de producto.

Características de la doxorrubicina liposomal

La doxorrubicina (**Figura 1**) es el miembro más conocido y utilizado del grupo antibiótico antraciclina de agentes anticancerosos. Se introdujo por primera vez en la década de 1970 y, desde entonces, se ha convertido en uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de tumores hematológicos y sólidos. La toxicidad que limita el tratamiento con este fármaco es la miocardiopatía que puede provocar insuficiencia cardíaca congestiva y la muerte. Aproximadamente el 2% de los pacientes que han recibido una dosis acumulada (de por vida) de doxorrubicina entre 450 y 500 mg/m² experimentan esta afección^[14].

La encapsulación de la doxorrubicina dentro de liposomas permite reducir los efectos adversos asociados a la forma libre de la droga manteniendo su potencia. De esta forma, pueden incrementarse las dosis administradas, resultando en un aumento en la eficacia e índice terapéutico^[12].

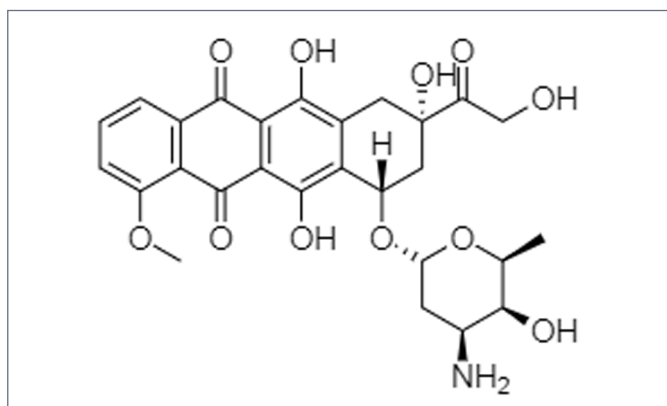


FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA DOXORRUBICINA.

Los productos liposomales parenterales presentan propiedades farmacocinéticas críticas, incluido el reconocimiento y la eliminación rápidos por el sistema de fagocítico mononuclear y prematura liberación de fármaco (inestabilidad). Las características fisicoquímicas, entre otras, son determinantes en el comportamiento *in vivo* de dichos productos^[11].

Entre las características relevantes de los liposomas, se debe incluir la composición y morfología, el estado del fármaco encapsulado, el entorno interno del liposoma, la distribución del tamaño de los liposomas, la fluidez de la membrana, el espesor de la capa de polietilenglicol (PEG) en la superficie del liposoma, el potencial o la carga de la superficie eléctrica y las tasas de fuga *in vitro*. Es deseable que los productos nanosimilares se comporten de forma análoga al producto comparador. Es por ello que, a los fines de definir “doxorrubicina liposomal nanosimilar” debe tenerse en consideración que, para el registro y evaluación de dicha especialidad medicinal mediante este documento, el producto a registrar deberá demostrar estrictas características de equivalencia estructural, fisicoquímica y de ensayos *in vivo* e *in vitro* con el correspondiente similar.

Definición de producto nanosimilar de doxorrubicina liposomal pegilada

Se definió como producto nanosimilar de doxorrubicina liposomal pegilada, a aquellos que cumplen con las siguientes características^[19]: concentración de 2 mg/ml de doxorrubicina clorhidrato a un pH de 6,5; dicha dispersión está constituida por liposomas unilamelares compuestos de N-(carbonilmetoxipolietilenglicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-Sal sódica de 3-fosfoetanolamina (MPEG-DSPE); fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC), y colesterol. En el interior acuoso de los liposomas, la doxorrubicina clorhidrato se encuentra en forma de cristal amorfo, estabilizada por un pH interno de 4,8.^[20,21] La **Figura 2** muestra una representación esquemática de un liposoma de doxorrubicina.

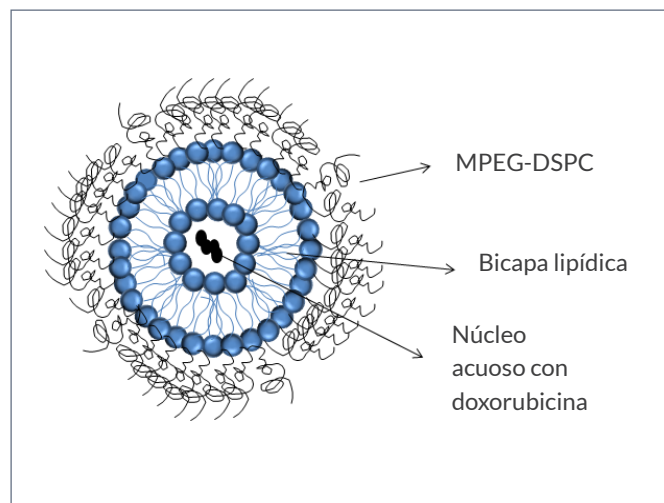


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE DOXORRUBICINA LIPOSOMAL.

DOCUMENTO PARA LA EVALUACIÓN DE REGISTRO DE DOXORRUBICINA LIPOSOMAL

La evaluación y trabajo conjunto por distintas áreas de la DFyGR del INAME dio como resultado la guía “*Documento para la evaluación de registro de Doxorrubicina Liposomal nanosimilar*”, en la cual se definen las características y parámetros relevantes tanto para la fabricación como para el control de estos productos. Se incluyen los ensayos necesarios para cumplimentar con los requerimientos regulatorios en cada uno de los puntos críticos del proceso. A continuación, se describen cada una de las características incluidas en el documento con los respectivos ensayos recomendados de llevar a cabo.

Las metodologías y especificaciones establecidas para cada uno de los ensayos que se detallan a continuación deberán ser sustentadas con información científica y serán sometidas a la evaluación por parte de la autoridad sanitaria.

1- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PRODUCTO

1.1. Descripción de la composición general (Sustancia activa, fracción lipídica y componentes no lipídicos): incluir concentración de la droga activa en mg/ml ó mg/vial.

1.2. Descripción del tipo de liposoma: unilamelar, multi, neutro, aniónico, catiónico, incluir toda característica morfológica de relevancia.

1.3. Componentes que integran el liposoma: indicar cada uno de los componentes que forman parte del liposoma: lípidos, fosfolípidos, solución acuosa, entre otros; incluyendo la concentración y proporción de cada uno de ellos, así como también indicar la función que cada uno cumple. Los componentes deberán tener una calidad acorde al fin destinado ya que para este producto se requiere una alta pureza y especificidad en las materias primas empleadas.

1.4. Origen de los lípidos que integran el liposoma: deberá indicar si son de origen sintético, semisintético o natural, e indicar el proveedor. Cualquier modificación deberá incluir una evaluación que determine el grado de influencia de dicho cambio en la seguridad, calidad y eficacia del producto. Se deberá notificar a la autoridad regulatoria la intención de realizar dicha modificación con el correspondiente análisis de riesgo y evaluación.

1.5. Tamaño y distribución de tamaño de los liposomas: deberá expresarlo como tamaño promedio y parámetros indicativos de la distribución (D10, D50 y D90).

1.6. Indicar las especificaciones correspondientes: los rangos permitidos para la identificación y valoración de cada uno de los componentes.

2- MATERIALES DE PARTIDA

En los trámites de registros se puede observar que la carga del principio activo se realiza por gradiente de pH en los *carriers* previamente formados, por lo tanto, se cuentan con diferentes materiales de partida:

2.1 Materias primas

2.1.1. Doxorrubicina clorhidrato: de acuerdo a las monografías codificadas en farmacopeas vigentes.

2.1.2. Componentes estructurales del liposoma: los excipientes empleados en la estructura del liposoma deben tener una calidad acorde al fin destinado. Se deberán incluir ensayos de identificación, valoración, evaluación de impurezas y posibles productos de degradación, isómeros, características de estabilidad, ensayos microbiológicos, entre otros. En aquellos casos que no se cuente con una monografía codificada en farmacopeas vigentes, deberá realizar el control de calidad de acuerdo a lo indicado por el proveedor de la materia prima.

2.2 Liposomas vacíos

Deberían realizarse como mínimo los siguientes ensayos:

2.2.1. Identificación de cada uno de los componentes del liposoma: mediante técnica de TLC, HPLC, entre otros.

2.2.2. Determinación de las cargas superficiales-Potencial Z: parámetro que brinda información sobre la posibilidad o no de agregación, estabilidad de la dispersión liposomal y da información sobre la posible interacción de los liposomas con el medio biológico y el tejido diana.

2.2.3. Determinación del pH de la dispersión liposomal.

2.2.4. Tamaño y distribución del tamaño de los liposomas: en este punto debe indicarse el tamaño medio de los liposomas, así como también el D10, D50 y D90.

2.2.5. Ensayos de estabilidad del liposoma vacío: aquí se solicita la presentación de un estudio de estabilidad con diferentes tipos de ensayos, de forma tal de determinar el tiempo límite y las condiciones de almacenamiento en la que pueden permanecer previo a la carga del principio activo sin modificar sus características. Los ensayos mínimos requeridos son:

A. Determinación de parámetros críticos que hacen a la estabilidad del liposoma frente a cambios deliberados en los parámetros a considerar (pH, osmolaridad, temperatura, entre otros).

B. Determinación de la estabilidad del liposoma en el tiempo transcurrido entre la elaboración y la carga: aspecto, pH, potencial Z, tamaño de partícula y distribución de tamaño, capacidad de carga.

2.2.6. Ensayos microbiológicos: determinar la carga biológica y de endotoxinas bacterianas de los liposomas vacíos, estableciéndose límites de aceptación, en base a la estabilidad de éstos desde el punto de vista microbiológico. En cuanto a la determinación de endotoxinas, se sugiere ver lo indicado para producto terminado (punto 3.18 de la presente guía). Asimismo, se deben establecer las medidas necesarias de contención frente a una posible contaminación microbiológica, según los lineamientos de las Disposiciones ANMAT N° 3602/2018 y N° 3827/2018. Finalmente, se debe controlar el nivel de carga biológica (bioburden, según su denominación en inglés) antes del paso de esterilización final, para cada lote de producto terminado elaborado, de acuerdo a lo indicado en la legislación citada.

3- PRODUCTO TERMINADO

Todos los ensayos deben realizarse sobre el producto en su envase primario.

3.1. Aspecto: detallar las características de forma inequívoca.

3.2. Caracterización morfológica del liposoma: dentro de los parámetros de importancia para la caracterización del liposoma se encuentra también la morfología ya que de ésta dependen diversos aspectos del desempeño biológico de la nanopartícula, tales como el flujo en los vasos sanguíneos, la extravasación y acumulación en el sitio de acción, y el desencadenamiento de la respuesta inmune^[23]. Se solicitará que se realice sobre el producto terminado de forma tal de corroborar la estructura, estado cristalino y disposición del principio activo en el liposoma, espesor de la bicapa lipídica y lamellaridad obtenidos con el proceso de fabricación empleado en la elaboración de

los liposomas. Este ensayo será requerido para el registro del producto (sobre los lotes sometidos a estabilidad), no como ensayo de rutina. Asimismo, el laboratorio deberá contar con la posibilidad de realizar estos ensayos, en caso de que la autoridad sanitaria así lo requiera.

En este sentido, el ensayo que se solicitará es Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), de forma de confirmar la estructura morfológica del nano-objeto, determinada indirectamente por otros ensayos. En particular, la técnica de cryo-TEM permite una mejor preservación de las vesículas y de otras estructuras que puedan coexistir.

A modo de ejemplo, se adjunta una serie de metodologías que serían consideradas aceptables de adicionar a la determinación, en caso de considerarlo oportuno. El conjunto de ensayos realizados debe aportar los parámetros requeridos en este ítem de caracterización morfológica.

- Espectroscopía de resonancia electroparamagnética
- Resonancia magnética nuclear
- Técnicas de fluorescencia
- Microscopía de fuerza atómica
- Otras técnicas espectroscópicas que aportan información relevante adicional, como IR, rayos x, dispersión láser, entre otras.

3.3. Propiedades termodinámicas del liposoma: otro parámetro crítico a determinar es la Temperatura de Transición de Fase (TTF) del liposoma, ya que esta se ve afectada por cambios en la composición de los lípidos que forman la estructura y brinda información de la fluidez y homogeneidad de los lípidos. Modificaciones en la TTF pueden afectar la efectividad de carga del liposoma, así como el estado y distribución del principio activo en el mismo.

3.4. Identificación: deberá realizarse la identificación del principio activo y de cada uno de los componentes estructurales del liposoma.

3.5. pH de la dispersión liposomal.

3.6. Ensayos farmacotécnicos para inyectables: volumen extraíble, partículas subvisibles, osmolaridad, opalescencia y límite de color.

3.7. Tamaño medio y distribución de partículas: deberá informarse el tamaño medio y la distribución indicando D10, D50 y D90.

3.8. Determinación de las cargas superficiales-Potencial Z.

3.9. Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) libre: deberá cuantificarse el principio activo que se encuentra en la dispersión de forma libre, es decir que no se encuentra encapsulado en el interior de la estructura liposomal.

3.10. IFA Encapsulado: deberá cuantificarse el principio activo que se encuentra encapsulado en el interior acuoso de los liposomas.

3.11. Valoración del IFA total: por tratarse de un producto nanofarmacéutico se solicitará se ajuste la especificación para el IFA total (libre + encapsulado) al rango 95-105% del valor declarado.

3.12. Eficiencia de carga de IFA: relación IFA libre / IFA encapsulado, disuelto, adsorbido o adherido.

3.13. Capacidad de carga: Relación IFA/moléculas lipídicas, cuando corresponda.

3.14. Impurezas Orgánicas provenientes del IFA: deberá evaluarse de acuerdo a los estudios de degradación forzada a los que deberá someterse el producto, al estudio de estabilidad y a la bibliografía disponible.

3.15. Uniformidad de Unidades de Dosificación: de acuerdo a la Disposición ANMAT N° 9943/2019 el ensayo debe realizarse por Uniformidad de Contenido.

3.16. Ensayo de liberación *in vitro*: estos productos representan un cambio de paradigma, en el cual el concepto de biodisponibilidad involucra la integridad de los liposomas en circulación, su biodistribución y su acumulación en tejido diana. Además, poseen un mecanismo de liberación del fármaco desde la plataforma que no se encuentra completamente dilucidado en la actualidad. Por estos motivos, se considera necesaria la realización de dos tipos de ensayos, el primero (A) tendrá como finalidad la evaluación de la *performance* farmacotécnica y consistencia lote a lote; mientras que el segundo ensayo (B) será utilizado para evaluar la integridad del nanovehículo en circulación sanguínea.

A. Ensayo de liberación del principio activo a diferentes pH y temperaturas: deberá diseñarse un ensayo que permita la evaluación de la liberación *in vitro* del principio activo, bajo múltiples condiciones de pH y temperaturas, representativas de las condiciones ambientales del tejido sano y tejido diana^[24].

B. Ensayo de integridad del liposoma en circulación: deberá diseñarse un ensayo que permita la evaluación de la integridad del liposoma en el plasma. Para dicho ensayo se podrá emplear como medio suero bovino, el cual deberá estabilizarse a 37 °C; el uso de membranas de diálisis de tamaño de poro adecuado resulta aceptable para este tipo de ensayo.

3.17. Ensayo de esterilidad: se deberá aportar la metodología de control microbiológico específica y detallada del producto objeto del registro y su correspondiente ensayo de aptitud, según los lineamientos del capítulo 370 de la Farmacopea Argentina^[22], o su equivalente de farmacopeas internacionalmente reconocidas. Los procedimientos de ensayo no deben verse afectados por las características del producto. En este sentido, deberá emplearse el método de filtración por membrana, con un tamaño de poro de 0,45µm, a menos que se especifique de otro modo según resulte del ensayo de aptitud realizado.

3.18. Endotoxinas: en este punto es importante la descripción detallada de la metodología incluyendo la preparación de la muestra. Existe evidencia científica que indica que, por la naturaleza lipofílica de las endotoxinas bacterianas, las mismas podrían quedar retenidas dentro de los liposomas. Por tal motivo, es recomendable realizar la ruptura de los nanoobjetos, como por ejemplo con tratamiento térmico, previa determinación de endotoxinas^[25]. Por otro lado, se debe describir inequívocamente la metodología empleada, ya que se describe en la bibliografía que las nanopartículas o componentes que acompañan a las

mismas como contaminantes (como los beta-glucanos) pueden interferir en el ensayo^[25,26]. Finalmente, tanto la metodología empleada como la determinación del Límite de Endotoxinas (LE) debe realizarse según los lineamientos de la Farmacopea Argentina o farmacopeas internacionalmente reconocidas. En este sentido, es aceptable un LE no mayor a 3.7 EU/mg, el cual surge de aplicar el cálculo teniendo en cuenta la dosis y la vía de administración del producto^[22,26,27].

3.19. Solventes residuales: Los mismos deberán determinarse de acuerdo a lo indicado en el capítulo 715 de la Farmacopea Argentina y deberán expresarse sobre el producto terminado^[22].

3.20. Caracterización de la capa de PEG para liposomas PEGilados: deberá realizarse un ensayo que permita estimar el espesor y disposición de la capa PEG en la superficie y la estabilidad de la conjugación.

3.21. Envase primario: se deberá aportar metodología del control de calidad del envase primario que incluya todos los ensayos listados para envases de vidrio en el capítulo 430 de la Farmacopea Argentina y los ensayos químicos, físicos y de reactividad biológica realizados a los tapones elastoméricos según farmacopeas internacionalmente reconocidas.

4- VALIDACIONES

4.1 Validación de las metodologías analíticas: deberá realizar la validación/ verificación (según corresponda) de cada una de las metodologías empleadas en el control de calidad del producto.

4.2 Validación del proceso de esterilización: es conocido que los métodos de esterilización pueden provocar cambios en las características fisicoquímicas de las nanopartículas, con consecuencias en su estabilidad y toxicidad^[28]. En este sentido, tal como se establece en la Disposición N° 9943/19, se requiere una evaluación del proceso de esterilización no solo desde el punto de vista microbiológico, sino también desde el punto de vista de las características intrínsecas del producto nanosimilar. Los trámites de registro hasta la fecha evaluados proponen como método de esterilización la filtración por membrana de 0,22 µm. Esta estrategia de esterilización se presenta una opción razonable para eliminar una posible contaminación microbiana para estas especialidades medicinales^[28,29]. Sin embargo, se quiere destacar la importancia de realizar los ensayos enumerados sobre el producto terminado, es decir una vez concluido todo el proceso de manufactura, a los fines de evaluar el impacto que puede acarrear dicho proceso sobre el producto.

5- ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Durante el estudio de estabilidad del producto terminado deberá contemplarse, como mínimo, la determinación de cada uno de los parámetros que figuran a continuación en cada uno de los intervalos estudiados:

5.1. Cuantificación del IFA: deberá realizarse la determinación del IFA total, IFA encapsulado y del IFA libre.

5.2. Ensayos que determinen la integridad del liposoma:

5.2.1. Determinación de las cargas superficiales: determinación del potencial Z.

5.2.2. Distribución y tamaño de partícula: informando tamaño medio y distribución de tamaño (D10, D50 y D90).

5.2.3. Posibles productos de degradación:

A. Ensayo de impurezas del IFA: de acuerdo con bibliografía disponible/ estudio de degradaciones forzadas, estado físico y a las posibles rutas de degradación. Incorporar especificaciones para impurezas individuales conocidas y desconocidas e impurezas totales.

B. Ensayo de impurezas del liposoma: determinación de posibles impurezas debido a posible degradación de los componentes estructurales del liposoma (ácidos grasos libres, índice de peróxidos, lisofosfolípidos, entre otros)^[30,31].

5.3. Tasa de fuga del IFA desde la nanopartícula a lo largo de la vida útil: este es un parámetro que se debe tener en cuenta al momento de la evaluación, dado que una alta tasa de fuga durante la vida útil debería considerarse una limitante en el límite inferior de la especificación de IFA encapsulado al momento de la liberación del producto, de forma tal de asegurar que el producto se encuentre dentro de las especificaciones durante toda su vida útil.

5.4. Estabilidad de producto reconstituido/diluido con cada uno de los solventes descritos en el prospecto, rótulos e información para el paciente a fin de asegurar los tiempos y las condiciones de conservación del producto hasta su total administración al paciente.

6- ENSAYOS DE COMPARABILIDAD

En primera instancia se solicitará la presentación de datos de similitud frente al producto comparador en cuanto a las características fisicoquímicas y estudios preclínicos detallados a continuación.

7- ESTUDIOS NO CLÍNICOS

Dada la complejidad que se asocia a los productos con características nanofarmacéuticas, los mismos requieren una evaluación diferenciada a los productos sintéticos tradicionales. En este sentido, se solicitará la realización de estudios preclínicos previamente a la aprobación de la especialidad medicinal.

El producto nanosimilar utilizado en los ensayos preclínicos deberá elaborarse utilizando el proceso de fabricación final (fórmula final)^[11]. Deben realizarse ensayos comparativos de farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad, frente al producto comparador, en especies relevantes respecto a la farmacología y seguridad del producto.

7.1. Farmacocinéticos: estudios cinéticos y toxicocinéticos a dosis simple y repetidas en distintos niveles de dosis (elegidas en base a niveles en sangre a dosis terapéuticas en humanos) en animales de experimentación, determinando en sangre, plasma o suero el IFA libre y el IFA asociado/encapsulado. Se debe demostrar la similitud del producto en estudio y el comparador, en cuanto a la absorción, distribución (con énfasis en áreas de acumulación y órganos de retención), metabolismo y eliminación de la droga y del *carrier*, y su impacto potencial en la seguridad^[11,32]. Justificar la elección de la especie.

7.2. Farmacodinamia: determinación de eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo*. Demostrar la similitud del producto similar y el comparador en la respuesta farmacodinámica, utilizando modelos *in vivo* apropiados, a varios niveles de dosis y régimen de dosificación justificados, según la aplicación clínica propuesta, elegidos teniendo en cuenta la sensibilidad del modelo. Caracterizar la interacción entre el *carrier* y células blanco u otras células con relevancia toxicológica, en ensayos *in vitro* e *in vivo*^[11,17].

7.3. Toxicología y Seguridad: estudios toxicológicos y de seguridad farmacológica a dosis única y repetidas, comparativos entre ambos productos, en especies relevantes. El diseño de los ensayos de toxicidad debe incluir la evaluación de los tejidos donde el nanoproducción podría acumularse y la evaluación específica de órganos blanco de toxicidad conocidos. Además, se debe incluir la evaluación de reactividad *in vitro* e *in vivo* y pruebas de pseudoalergia relacionadas con la activación del complemento (CARPA) en modelos animales sensibles^[11,33].

8- MANUFACTURA

Si bien aquí aplica y se requerirá todo lo referente a la Disposición ANMAT N° 3602/18 (t. o. N° 3827/18), se hace hincapié en los siguientes puntos:

- 8.1. Descripción de la formulación (cuali-cuantitativa), indicando la función de cada uno de los componentes.
- 8.2. Control de productos intermedios y granel.
- 8.3. Descripción detallada de cada uno de los pasos individuales del proceso de manufactura.
- 8.4. Descripción de los materiales críticos y parámetros sensibles a las variaciones que permitan una adecuada caracterización del producto; en este punto se requerirá la descripción exhaustiva de cada uno de los parámetros críticos del proceso.

9- CAMBIOS POST-REGISTRO

Pequeñas modificaciones en la calidad de las materias primas, formulación y/o en los procesos de elaboración de productos liposomales pueden impactar sobre la estabilidad e integridad de las especialidades medicinales nanotecnológicas, así como también sobre los efectos farmacológicos, especificidad en la interacción producto/célula, biodistribución, llegada al órgano blanco, inmunogenicidad y toxicidad de los mismos.

Es por ello que los laboratorios deberán informar a la autoridad sanitaria cualquier cambio que tuviese intención de realizar, debidamente justificado, tanto sobre los proveedores de las materias primas y productos semielaborados como sobre los procesos de fabricación, acondicionamiento y almacenamiento. Dichas modificaciones serán evaluadas caso por caso, dependiendo de la modificación que el laboratorio quisiese realizar y se emitirá un dictamen sobre la factibilidad de las mismas y/o los nuevos requerimientos de documentación y ensayos que el laboratorio deberá llevar a cabo para su aprobación.

CONCLUSIÓN

La caracterización estructural completa, así como también la evaluación preclínica (farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad) de estos productos es de suma relevancia al momento de determinar la nanosimilaridad. Las características únicas de estos productos introducen un nuevo paradigma al concepto tradicional de biodisponibilidad, en el cual la biodistribución y acumulación en el tejido diana juegan un papel crucial en la efectividad de la especialidad medicinal liposomal.

Es por ello que, desde la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, se decidió implementar un sistema de seguimiento continuo sobre los productos nanofarmacéuticos, el cual se llevará a cabo desde las instancias iniciales del proceso de registro, autorización de comercialización y fiscalizaciones periódicas post-registro, de forma de asegurar que los productos presentes en el mercado sean seguros, eficaces y de calidad, en virtud de promover y proteger la salud pública.

Con el fin de unificar el estándar regulatorio y de calidad de los productos en el mercado, en una segunda etapa se incorporarán otros principios activos, así como también todas las especialidades medicinales alcanzadas por la Disposición ANMAT N° 9943/19.

Los requerimientos descritos en este trabajo serán sometidos a revisiones periódicas con el fin de ir actualizándose en concordancia con el avance del conocimiento científico, las tecnologías emergentes, como así también en lo concerniente a la regulación de estos productos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Rashidi L, Khosravi-Darani K. The Applications of Nanotechnology in Food Industry. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2011; (51):723-730.
- 2- Wong YWH, Yuen CWM, Leung MYS, Ku SKA, Lam HLI. Selected Applications of Nanotechnology in Textiles. AUTEX Research Journal. 2006; (6): 1-8.
- 3- Poulos NG, Hall JR, Leopold MC. Functional Layer-By-Layer Design of Xerogel-Based First-Generation Amperometric Glucose Biosensors. Langmuir. 2015; (31): 1547-1555.
- 4- Li J, Yan X, Li X, Zhang X, Chen J. A new electrochemical immunosensor for sensitive detection of prion based on Prussian blue analogue. Talanta. 2018; (179): 726-733.
- 5- Muraca GS, Talevi A, Pesce GO. Enfermedad de Chagas: novedades en nanomedicina como estrategia terapéutica. Revista Ciencia Reguladora. 2019; (5): 32-37.
- 6- Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. J. Occup. Med. Toxicol. 2007; (2): 16-22.
- 7- Du Y, Chen W, Zheng M, Meng F, Zhong Z. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. Biomaterials. 2012; (33): 7291-7299.
- 8- Popovska O, Simonovska J, Kavrovski Z, Rafajlovska V. An Overview: Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. Int. J. Pharm. Biopharm. Res. 2013; 3 (3): 182-189.

- 9- Gregoriadis, G. *Liposomes Technology*. 3° edición. London, U.K: The School of Pharmacy University of London and Lipoxen PLC. 2007; 1-268. Vol. 1. Liposome Preparation and related techniques.
- 10- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013; (8): 102-111.
- 11- Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02 Committee for Human Medicinal Products (CHMP). 2013.
- 12- Tardi PG, Boman NL, Cullis PR. Liposomal Doxorubicin. *J Drug Target*. 1996; 3 (4): 129-140.
- 13- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of Liposomes of defined size Distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Bioch. Et Biophysics Acta*. 1979; (557): 9-23.
- 14- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *Methods in Enzimology*. 2005; (391): 71-97.
- 15- Disposición ANMAT 9943/2019; DI-2019-9943-APN-ANMAT#MSYDS; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2019.
- 16- Liposome Drug Products-Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. Food and Drug Administration, 2018.
- 17- Guideline for the Development of Liposome Drug Products. MHLW, Japón, 2016.
- 18- Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Food and Drug Administration, 2014.
- 19- DOXIL® (doxorubicin HCl liposome injection) for intravenous infusion Initial U.S. Approval: 1995, Food and Drug Administration.
- 20- Madden TD, Harrigan PR, Tai LCL, Bally MB, Mayer LD, Redelmeier TE, Loughrey HC, Tilcock CPS, Reinish LW, Cullis PR. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chemistry and Physics of lipids*. 1990; (53): 37-46.
- 21- Mayer LD, Cullis PR, Bally MB. The use of transmembrane pH gradient-driven drug encapsulation in the pharmacodynamic evaluation of liposomal doxorubicin. *Journal of Liposome research*. 1994; 4 (1): 529-553.
- 22- Farmacopea Argentina, 7° Edición. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2013 y primer suplemento 2019.
- 23- Wibroe PP, Ahmadvand D, Oghabian MA, Yaghmur A, Moein Moghimi S. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. *J. Control. Release*. 2016; (221): 1-8.
- 24- Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos, D. Thermosensitive Sterically Stabilized Liposomes: Formulation and in Vitro Studies on Mechanism of Doxorubicin Release by Bovine Serum and Human plasma. *Pharmaceutical Research*. 1995; 10 (12): 1407-1416.
- 25- Neun BW, Dobrovolskaia MA. Considerations and some practical solutions to overcome nanoparticle interference with LAL assays and to avoid endotoxin contamination in nanoformulations. In: McNeil S (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press. 2018; p. 23-33.
- 26- Neun BW, Dobrovolskaia MA. Detection of Endotoxin in Nano-formulations Using Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Assays. *Journal of Visualized Experiments*. 2019; (143): e58830.
- 27- United States Pharmacopeia -NF. Capítulo (85) Prueba de Endotoxinas Bacterianas.
- 28- Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014; (10): 1391-1399.
- 29- Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; (154): 123-140.
- 30- Piraube C, Postaire E, Lize JM, Prognon P, Pradeau D. Evidence of Chemical Instability of Phospholipids in Liposomes. *Chem.Pharm.Bull*. 1988; 36 (11): 4600-4602.
- 31- Grit M, Crommelin DJ, Lang J. Determination of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and their lyso forms from liposome dispersions by high-performance liquid chromatography using high-sensitivity refractive index detection.) *Journal of Chromatography*. 1991; 2 (585): 239-246.
- 32- Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry. DRAFT GUIDANCE. Food and Drug Administration, 2017.
- 33- Szebeni J, Bedöcs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012; (8): 176-184.

DIAGNÓSTICOS POINT-OF-CARE: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR ASAS COMO ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN Y PREVENCIÓN DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Point-of-care diagnostics: loop mediated isothermal amplification for detection and prevention of hemolytic uremic syndrome

Ezequiel Blanco^a, Rosana Alves^b.

^a Laboratorio de Control de Calidad Físico-Químico, Laboratorios Abbott,
Florencio Varela, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

^b Área de Microbiología Clínica, Hospital General de Agudos José María Penna,
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: blanco.ezequiel16@gmail.com

Recibido: 24 de enero de 2020. Aprobado: 9 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad que se caracteriza por un fracaso renal agudo (o crónico) que afecta principalmente a la población pediátrica. Su etiología es variable, aunque la más frecuente está asociada a la ingesta de alimentos contaminados con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga. En Argentina, esta enfermedad representa un grave problema de salud pública debido a la tasa alta de ocurrencia y a la falta de un tratamiento específico; esto revela la importancia de la inmediatez y la eficiencia con que intervienen todos los agentes involucrados en la prevención primaria a fin de reducir el impacto sanitario. En este entramado se discute la aplicación de la técnica de Amplificación Isotérmica de ácidos nucleicos Mediada por Asas (LAMP, por sus siglas en inglés), cómo método de diagnóstico alternativo a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), hoy ampliamente utilizada en centros de referencia. Para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica para analizar el contraste PCR vs LAMP en el marco de los requisitos "ASSURED" de técnicas *point-of-care* adoptados por la Organización Mundial de la Salud. Con un inicial abordaje molecular, se resaltan características diagnósticas, tales como la universalidad de la aplicación, especificidad, sensibilidad de la técnica, las cuales postulan a la LAMP como una herramienta rápida, oportuna y confiable para la detección de una gran cantidad de patógenos bacterianos.

Palabras clave: Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, LAMP, técnicas *point-of-care*, *E. coli* O157:H7, gen *rfbE*.

ABSTRACT

The Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a disease characterized by an acute (or chronic) renal failure that mainly affects the pediatric population. Its etiology is variable, although the most frequent one is associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contaminated food. In Argentina, this disease represents a serious public health problem due to high incidence rate and lack of specific treatment; this reveals the importance of the immediacy and efficiency that agents involved in primary prevention utilize in order to reduce the health impact. The application of the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique is discussed in this framework as an alternative diagnostic method to Polymerase Chain Reaction (PCR), still widely used in reference centers. For the development of this work, a bibliographic review was carried out to analyze the PCR vs LAMP contrast within the framework of the "ASSURED" criteria of *point-of-care* testing techniques adopted by the World Health Organization. In an initial molecular approach, diagnostic characteristics, such as the universality of the application, specificity, and sensitivity of the technique are highlighted, which nominate LAMP as a fast, timely and reliable tool for the detection of a large number of bacterial pathogens.

Keywords: Loop mediated isothermal amplification, LAMP, *point-of-care* techniques, *E. coli* O157:H7, *rfbE* gen.

Síndrome Urémico Hemolítico

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), consecuente a la ingesta de la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 productora de Shiga Toxina (STEC, por sus siglas en inglés), es una enfermedad grave que afecta principalmente a niños menores de 5 años y se caracteriza por conducir a un fallo renal agudo o crónico que, en ocasiones, puede causar la muerte o dejar secuelas para toda la vida.

La República Argentina, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), es un área endémica donde se producen más de 400 casos por año^[1]. La vigilancia epidemiológica indica que la carne picada cruda, los vegetales crudos, el agua de consumo no potable y el contacto con animales de granja son las principales fuentes de infección y, en consecuencia, donde se debería intervenir^[2].

La transmisión ocurre a través de la vía fecal-oral, frecuentemente a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados o contacto directo con personas o animales infectados u objetos contaminados. El ganado bovino y otros rumiantes son considerados el principal reservorio de STEC O157:H7 y en nuestro país la cepa de *E. coli* productora de Shiga II (Stx II) es la prevalente^[3]. La importancia del serotipo *E. coli* O157:H7 radica en varios aspectos siendo uno de los más importantes el bajo inóculo que se requiere para infectar al humano, así como también sus factores de virulencia asociados a la producción de sus toxinas por parte de los genes *slt-I* y *slt-II*, el gen *eaeA* para la intimina, el gen de la *uidA* para la betaglucuronidasa y el gen *rfbE* que es específico del serotipo O157, codificante del lipopolisacárido O^[4]. La evidencia científica apunta a utilizar este último gen como marcador específico del serotipo O157, utilizando técnicas de biología molecular de vanguardia, una de ellas es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por asas o LAMP, por sus siglas en inglés. Estudios realizados en diversas matrices de muestra comparan su alcance con la clásica reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta la endemicidad y la gravedad de la infección, hoy en día la estrategia de notificación tiene una modalidad individual y de forma inmediata. Los datos para la vigilancia del SUH se originan mediante cuatro subsistemas: la notificación en la Planilla C2, las Unidades Centinelas, el SIVILA y la red regional PulseNet Latino América. El nivel central está compuesto por la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud y los Institutos del ANLIS-MALBRAN, como laboratorio nacional de referencia que, al originarse un nuevo caso, inician una investigación epidemiológica para evitar la aparición de casos secundarios^[5-7].

Fisiopatogenia y manifestación clínica del Síndrome Urémico Hemolítico

El SUH se define como un fracaso renal agudo (o crónico) consecuente a una anemia hemolítica microangiopática con valores de hemoglobina entre 7-10 g/dL, con casos muy graves cuyos valores se encuentran por debajo de 7 g/dL.

Los pequeños traumatismos en los vasos, debido a la Stx, generan la lisis de los hematíes de forma mecánica en el endotelio

glomerular. También se genera una trombocitopenia similar a la ocasionada en casos de coagulación intravascular diseminada y, en ciertas ocasiones, muy acusada con una disminución marcada del conteo de plaquetas ($< 50.000/\text{mm}^3$)^[8]. Si bien esta triada de anemia-trombocitopenia-fallo renal es patognomónica de la enfermedad, también puede estar acompañada de diarrea sanguinolenta, fiebre y dolor abdominal, siendo los lactantes y niños en la primera infancia, los más vulnerables.

La letalidad durante el período agudo es del 3 al 5% debido al diagnóstico precoz de la enfermedad, instauración temprana de la diálisis y el manejo de la anemia hemolítica. El período de incubación es de dos a diez días, con una media de tres a cuatro días. Luego del comienzo de la diarrea, el período de transmisibilidad es de hasta tres semanas en los niños y de una semana o menos en los adultos^[9]. A expensas de un endotelio glomerular dañado por la toxina, al evolucionar el SUH, el paciente presenta un alto de compromiso del sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón^[10-11]. Del resto de los pacientes y superada la fase aguda, el 60% se recupera sin tener secuelas después de dos o tres semanas de hospitalización. Es crítico un correcto manejo del paciente ya que aún sin síntomas, continúa eliminando la bacteria por materia fecal.

Esta patología implica grandes costos económicos para el sistema de salud, lo cual tiene un impacto importante en los países en desarrollo^[12]. Es importante destacar que diversas fuentes se refieren al SUH con características propias de brotes epidémicos debido a la circunscripción de los casos.

La Argentina presenta la mayor incidencia anual de casos de SUH en menores de 5 años en el mundo. En el año 2003, la tasa de hospitalización fue de 11,5 casos por cada 100.000 niños, dentro de este grupo. Un lustro más tarde, en el 2008 se presentó otro pico de casos (543) correspondiente al período 2005-2013^[5,6]. Coincidentemente con los reportes previos, el grupo etario más afectado fue el de los niños menores de 5 años, comprendiendo el 81% (1238) de casos en el período 2010-2013. Los datos mostrados por el boletín de vigilancia del SUH publicado por el Ministerio de Salud en el año 2018, el cual analiza información recopilada entre los años 2011 y la semana epidemiológica 17 (SE17) de 2018, arrojaron una tasa acumulada de 0,81 casos cada 100.000 habitantes^[10]. Con respecto a los menores de 5 años hasta la SE17 del 2018 se notificaron 75 casos con una mediana de 82 para el período 2010-2017 hasta la misma SE. Siendo el SUH endémico, la modalidad de la notificación es obligatoria e inmediata desde el mes de abril de 2000 (Resolución N°346/00). La modalidad actual es individual y la estrategia involucra la recolección de datos con las fichas C2, L2 y Ficha especial^[5-10].

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), organismo regulador de referencia, establece guías sobre el estudio de muestras de alimentos tanto para el *screening* como para el aislamiento y la tipificación de microorganismos, siguiendo los lineamientos del procedimiento según USDA/FSIS: 2010^[16,17]. Entre las técnicas de *screening* y aislamiento se menciona la utilización de la amplificación por PCR y métodos microbiológicos convencionales. En

concordancia con esto, diversos estudios realizados por la Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán^[18] reafirman su utilización. Estos procedimientos son específicos y precisos, pero presentan ciertas características que, a veces, entorpecen o imposibilitan su implementación; entre ellos se destaca que requieren de una clara expertise técnica, así como hasta 24hs para obtener un resultado. La amplificación por PCR a los fines diagnósticos sólo puede realizarse si se cuenta con un termociclador, un aparato de costos sumamente elevados para laboratorios de mediana a baja envergadura que, a menudo, terminan tercerizando los ensayos confirmatorios. Sumado a lo anterior, la necesidad de confirmar un diagnóstico (envío de la muestra y espera de respuesta) requiere tiempo del que muchas veces no se dispone. El método de LAMP ofrece una alternativa a todas estas cuestiones con grandes ventajas como su sensibilidad, especificidad y tiempos reducidos.

LAMP: fundamentos moleculares y detección

El principio de la reacción LAMP involucra una mezcla de reacción que consiste en: dNTPs, una polimerasa, un fluorocromo (calceína), 4 a 6 *primers* y el templado de ADN. Los reactivos se encuentran liofilizados en el tubo de reacción, por ende, el agregado al mix consta de *primers* específicos que reconocen 6 a 8 regiones del ADN/ARN blanco y la muestra que se desea analizar^[19].

La enzima que extiende la cadena en esta técnica se denomina *Bst* polimerasa y a diferencia de la *Taq* polimerasa, no posee la propiedad 5'-3' exonucleasa^[19,20]. La reacción se caracteriza por el uso de 4 a 6 *primers* diferentes especialmente diseñados

para reconocer 6 a 8 regiones distintas del ADN/ARN que se quiere estudiar. El *Forward Inner Primer* (FIP) consiste en una región F2 en el Extremo 3' y una región F1c en el extremo 5'; *Forward Outer Primer* (F3 Primer) consiste en una región F3 que es complementaria a la región F3c de la secuencia del templado; *Backward Inner Primer* (BIP) consiste en una región B2 en el extremo 3' y una región B1c en el extremo 5'. *Backward Outer Primer* (B3 Primer) consiste en una región B3 que es complementaria a la región B3c de la secuencia del templado (Figura 1).

La amplificación comienza cuando la región F2 de FIP hibrida con la región F2c del ADN objetivo e inicia la síntesis complementaria de la cadena, seguido a esto el *primer* F3 que hibrida a la región F3c del ADN objetivo y se extiende, desplazando la cadena complementaria unida a FIP. Esta hebra desplazada da forma a un bucle o *loop* en el extremo 5'. Este ADN monocatenario con un *loop* en el extremo 5' sirve como plantilla para BIP. B2 se hibrida con la región B2c del templado de ADN. Se inicia entonces la síntesis de ADN que conduce a la formación de una cadena complementaria y apertura del bucle del extremo 5'. Posteriormente, B3 se hibrida a la región B3c del ADN objetivo y se extiende, desplazando la cadena complementaria unida a BIP. Esto da como resultado la formación de una forma de mancuerna de ADN^[20-25].

Los nucleótidos se agregan al extremo 3' de F1 por la *Bst* polimerasa que se extiende y abre el bucle en el extremo 5'. La forma de pesa de ADN ahora se convierte en una estructura de bucle vástago (a y b) que sirve como iniciador para la amplificación exponencial, que es la segunda etapa de la reacción LAMP. Componentes extra

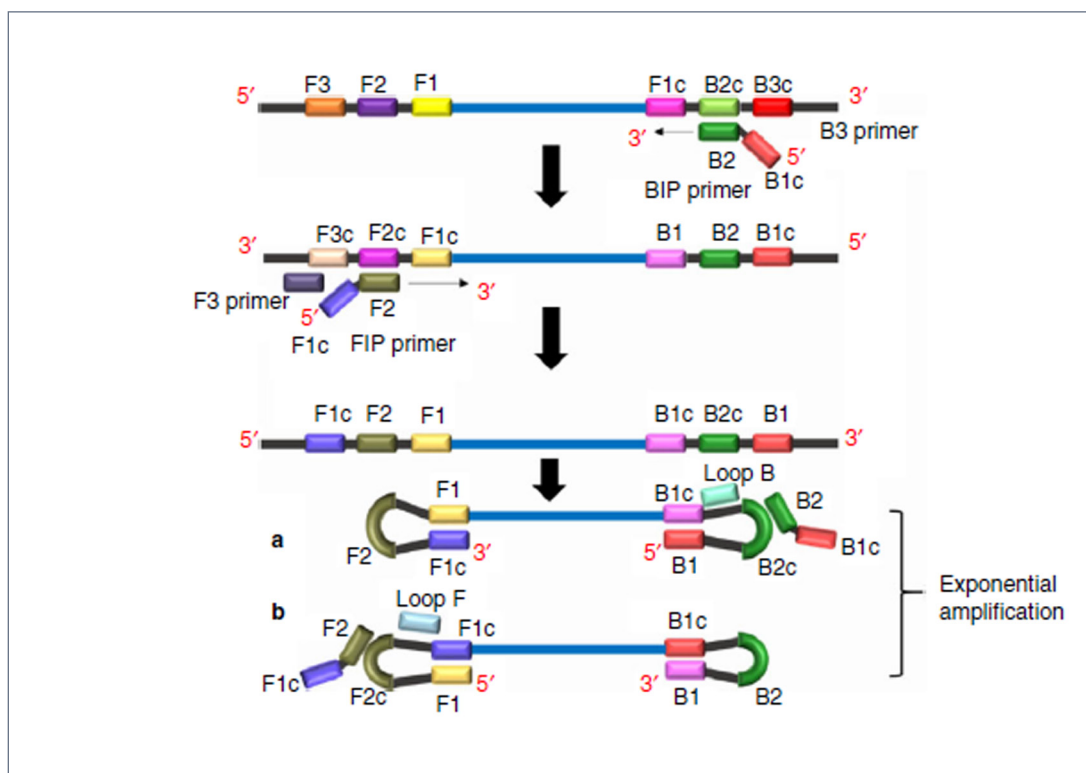


FIGURA 1. MECANISMO DE LA REACCIÓN LAMP (EXTRAÍDO DE WONG, Y. P ET AL, 2018).

como los *loop primers* también se pueden agregar para generar tiempos más cortos de entrega de resultados. La amplificación se da a una misma temperatura (60-65°C) eliminando la necesidad de costosos termocicladores y los productos finales obtenidos son varias estructuras de tipo coliflor con múltiples bucles que se pueden observar al ojo desnudo^[25-30].

La detección de producto de amplificación se puede determinar a través de fotometría de la turbidez causada por una cantidad cada vez mayor de precipitado de pirofosfato de magnesio en solución como un subproducto de la amplificación. Antes de la reacción, la calceína, como reactivo, no emite fluorescencia ya que está unida a iones de manganeso que actúan como inactivadores o *quenchers*. Una vez que la reacción LAMP comienza, los iones pirofosfato

generados se unen a esos iones de manganeso, liberando la fluorescencia de la calceína a niveles tales que permiten la simple detección visual^[24].

La reacción se puede seguir en tiempo real, ya sea mediante la medición de la turbidez o por fluorescencia y ser correlacionado con el número de copias presentes inicialmente, por lo tanto, también puede ser cuantitativa^[23].

A diferencia de la PCR, la LAMP encuentra su desarrollo en la necesidad de disponer de técnicas moleculares simples y costo-efectivas. Sus puntos clave radican en: su corto tiempo de incubación de menos de 1 hora y su fácil detección del producto amplificado (a ojo desnudo, SYBR Green II y exposición a radiación ultravioleta -UV-) (Figura 2).

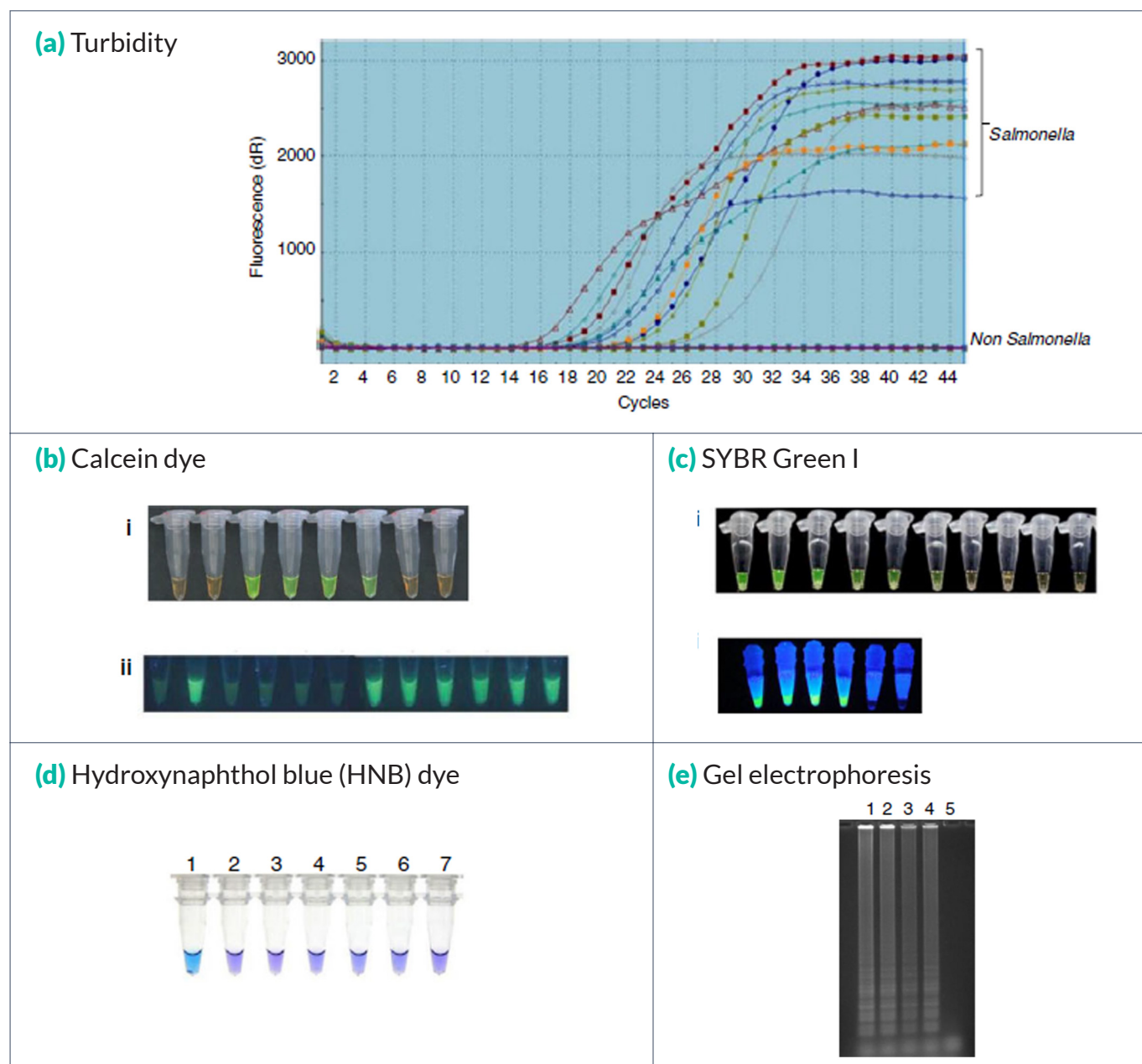


FIGURA 2. MÉTODO DE DETECCIÓN DEL PRODUCTO DE LAMP. **A.** MEDICIÓN EN TIEMPO REAL CON TURBIDIMETRÍA. **B. I.** CALCEÍNA- **II.** CALCEÍNA AL UV. **C. I.** SYBR GREEN- **II.** SYBR AL UV. **D.** INDICADORES DE PH COMO HIDROXINAFTOL AZUL (HNB). **E.** ELECTROFORESIS EN GEL. (EXTRAÍDO DE WONG, Y. P, 2018).

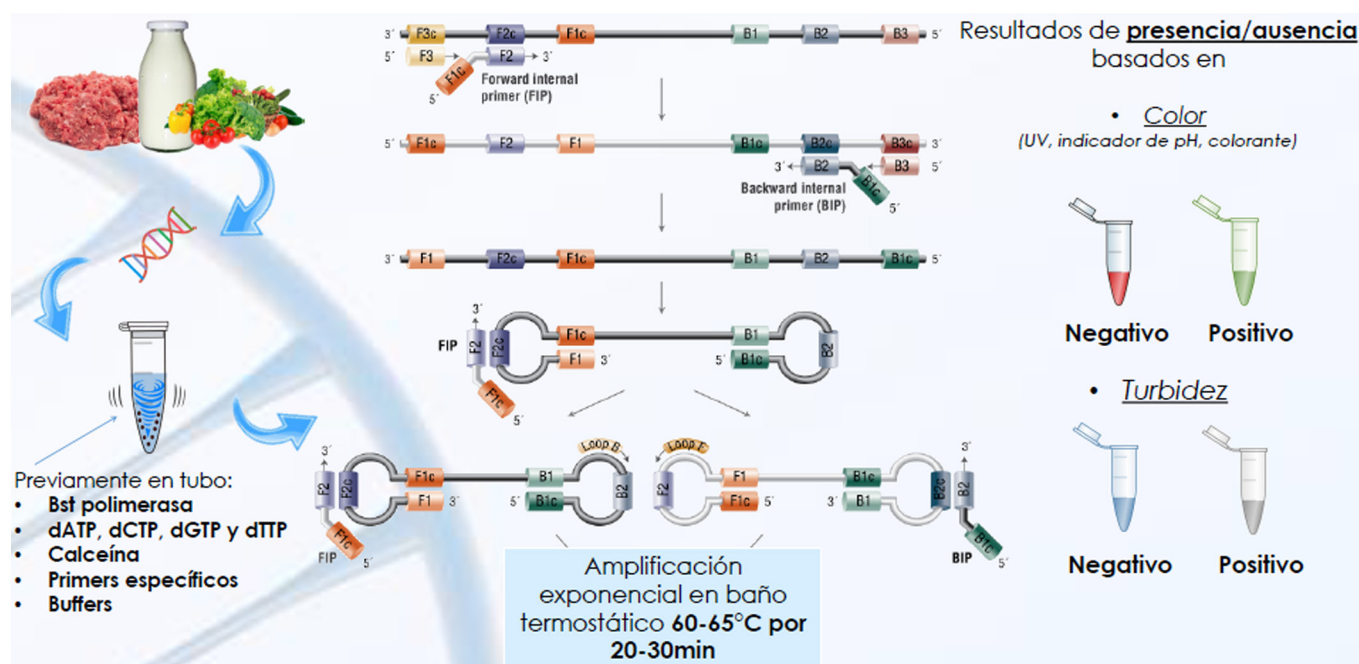


FIGURA 3. ESQUEMA DE LOS PASOS DE LA LAMP. IMAGEN DE PROPIA AUTORIA, PRESENTADO EN EL POSTER PARA EL PRIMER CONGRESO DE ALIMENTOS DE ANMAT 2019.

En el marco de la detección de STEC O157:H7, diversos estudios proponen la utilización del gen *rfbE* que es específico del serotipo O157^[15-17]. Como se observa en la **Figura 3**, la extracción del ADN/ARN puede ser de diversas matrices de muestra como carnes^[17-20,25,27], leche cruda, queso^[30] o material vegetal^[31].

LAMP vs PCR en la detección de STEC O157:H7

En las fuentes consultadas se destaca un concepto denominado “ASSURED criteria”^[12] adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un criterio genérico de aproximación a nuevas técnicas diagnósticas, en el marco de ensayos *point-of-care* (POC). Los ensayos dentro de esta terminología sugieren que una técnica de diagnóstico debe ayudar a la toma oportuna de decisiones para abordar el correcto tratamiento, mejorar la eficiencia del cuidado al paciente y reducir costos, especialmente en laboratorios de bajos recursos (LRS por sus siglas en inglés). Un esquema simple y didáctico sobre los criterios “ASSURED” se muestra en la **Figura 4**.

A = Affordable
S = Sensitive
S = Specific
U = User-friendly (simple to perform in a few steps with minimal training)
R = Robust and rapid (results available in less than 30 min)
E = Equipment-free
D = Deliverable to those who need them

FIGURA 4. OMS “ASSURED” CRITERIO (EXTRAÍDO Y ADAPTADO DE LABARRE P. ET AL. 2011).

Siguiendo como regla general estos requisitos a continuación, se analiza cada ítem y su cumplimiento (o no) por ambas técnicas. Por “affordable” se entiende que una técnica diagnóstica debe ser accesible. El pequeño número de laboratorios centralizados que existen en los países en desarrollo tienden a estar en áreas urbanas y atienden principalmente a las personas que rodean las mismas. Por el contrario, las instalaciones de atención médica del área rural o periurbana comúnmente tienen solo equipo básico y los trabajadores de la salud tienen capacitación limitada y poca capacidad para mantener el equipo y manejar los reactivos. Por lo que técnicas como la PCR, que requieren de personal capacitado y termocicladores por demás costosos, presentan esta inicial dificultad en su aplicación universal^[16]. La LAMP puede ser llevada a cabo, respetando las normas de bioseguridad estándar, en casi cualquier locación que cuente con un área específicamente dispuesta para su realización y un baño termostático que usualmente es un equipo adquirido por la mayoría de los laboratorios de baja a mediana envergadura. La verdadera inversión radica en comprar los tubos de reacción con los reactivos ya liofilizados en su interior.

En cuanto a la especificidad (“specificity”), Xihong Zhao et al^[20] se propusieron analizar la detección de la *E. coli* O 157 en muestras de origen alimenticio. En su trabajo compararon las características diagnósticas de la técnica PCR con la LAMP teniendo como marcadores específicos los genes *rfbE*, *stx1* y *stx2*. Con un N de 417 muestras obtuvieron valores de predicción tanto positivos (*positive predicted values*, PPV) como negativos (*negative predicted values*, NPV) del 100% para el primer gen y 100% de especificidad para todos ellos. También utilizaron 34 aislados Gram negativos (27) y Gram positivos (7) para evaluar la especificidad de ambas técnicas. Sus resultados mostraron que,

de 154 muestras, la LAMP obtuvo una especificidad del 100% (154) para muestras positivas de *E. coli* portadoras del gen O157 mientras que la PCR sólo detectó 146 (Tabla 1). Reza Ranjbar et al^[21], encontraron resultados similares (Figura 5). Por otro lado, Yukiko Hara-Kudo et al^[22], en sus estudios evaluaron mediante

LAMP 24 cepas de *E. coli* productoras de verotoxina (VT1 y VT2) y todas mostraron resultados positivos, 6 cepas no productoras de verotoxina fueron negativas y, para reconfirmar, evaluaron 46 especies adicionales no productoras que tampoco fueron detectadas (Tabla 2).

TABLA 1. CEPAS ATCC ENSAYADAS MEDIANTE LAMP (EXTRAÍDO DE ZHAO X. ET AL. 2010).

Cepas de referencia	N° de cepas	Ensayo LAMP		
		rfbE	stx1	stx2
Organismos Gram-negativo				
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF01201 ATCC43889, NCTC12900	3	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF07803, WF06544, WF05395	3	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF04402, WF05311, WF06837	3	+	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF04587, WF08385, WF06349	3	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> O26: H11 WF054489	1	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> O127: H6 WF073522	1	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> O148: H28 WF063224	1	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> C600 ATCC 25922, ATCC8739, C600, DH5a	4	-	-	-
<i>Psuedomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 13312	1	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> SK10	1	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	1	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	1	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> GH31	1	-	-	-
Organismos Gram-positivo	1	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 29887	1	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> GH152	1	-	-	-
<i>Stretococcus pyogenes</i> GH126	1	-	-	-
<i>Stretococcus mitis</i> GH185	1	-	-	-
<i>Stretococcus pneumoniae</i> GH165	1	-	-	-
<i>Stretococcus hemolyticus</i> GH177	1	-	-	-
Total	34	-	-	-

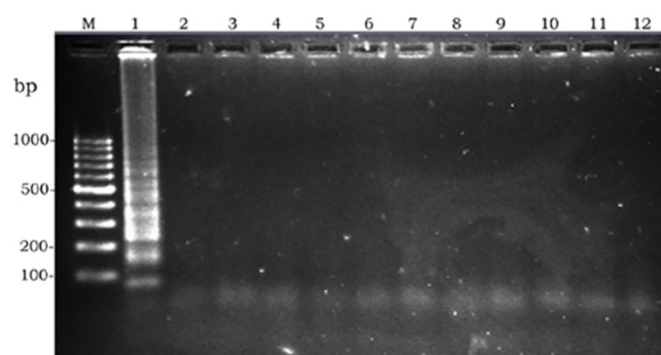


FIGURA 5. TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO PARA ESTUDIAR LA ESPECIFICIDAD DE LA LAMP CONTRA CEPAS ATCC GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS. REFERENCIA IZQ. A DER: M, MOLECULAR WEIGHT. 1, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7. 2, *SHIGELLA DYSENTERIAE*. 3, *SHIGELLA FLEXNERI*. 4, *SHIGELLA SONNEI*. 5, *SHIGELLA BOYDII*. 6, *SALMONELLA TYPHI*. 7, *SALMONELLA ENTERITIDIS*. 8, *SALMONELLA INFANTIS*. 9, *SALMONELLA MURIUM*. 10, *VIBRIO CHOLERA*. 11, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. 12, CONTROL NEGATIVO. (EXTRAÍDO DE RANJBAR, R., ET AL. 2016).

TABLA 2. ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA LAMP EN DISTINTAS MATRICES DE MUESTRA (EXTRAÍDO DE HARA-KUDO, Y. 2007).

Sensibilidad y especificidad de <i>E. coli</i> O157					
Método	Sensibilidad			Especificidad	
	Carne picada	Brote de alfalfa		Carne picada	Brote de alfalfa
	(Bajo nivel) ^a	Alto nivel ^a	Bajo nivel		
LAMP assay	1.000 (60/60) ^b	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.983 (59/60) ^c	1.000 (60/60)
IMS-plating					
CT-SMAC	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.983 (59/60)	0.950 (57/60)
CHROMAgarO157TAM	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
Subtotal	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)	0.992 (119/120)	0.975 (117/120)
Direct plating					
CT-SMAC	1.000 (60/60)	0.983 (59/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
CHROMAgarO157TAM	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.917 (55/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
Subtotal	1.000 (120/120)	0.992 (119/120)	0.958 (115/120)	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)

^a Bajo nivel: 11.7 UFC/25g, Alto nivel: 46.8 UFC/25g.

^b N°. de muestras positivas/ inoculadas con *E. coli* O157.

^c N°. de muestras negativas / sin inocular con *E. coli* O157.

En cuanto a los estudios de sensibilidad (“*sensibility*”), cabe mencionar que se detectó material genético en diluciones de ADN blanco en el orden de los picogramos (pg). Esto cobra especial importancia ya que normalmente los inóculos en los alimentos contaminados suelen ser ínfimos y escapan al alcance de ciertas técnicas de detección. En este sentido, los ensayos que fueron positivos para la LAMP, no lo fueron para la PCR^[17]. En la **Figura 6** se muestran los resultados de Xihong Zhao et al^[20], quienes obtuvieron su límite de detección en el orden de los femtogramos (fg), equivalente a la milbillonésima parte de un gramo (1 fg = 10⁻¹⁵ g). Cabe recordar la ínfima dosis infectiva del patógeno analizado que se encuentra en el orden de 10-100 bacterias por gramo.

Como se observó en el apartado anterior, el punto final de la técnica LAMP puede detectarse a ojo desnudo (turbidez) o usando colorantes (SYBR Green), indicadores de pH o la exposición a luz UV debido a la gran cantidad de amplicón generado. En cambio, para detectar los productos de PCR es necesario un termociclador que analice la fluorescencia emitida (qPCR).

Los reactivos se comercializan de manera liofilizada en un tubo de reacción, lo cual agiliza los pasos en su utilización. En contraste, la PCR requiere la realización del mix, adicionando cada reactivo a un tubo de microcentrífuga y luego rellenar los pocillos de reacción, seguido de la adición de las muestras que finalmente serán introducidas al termociclador. Aquellos que realizan dicha tarea suelen ser operarios altamente capacitados, pero a pesar de esto, la probabilidad de cometer un error es alta debido a los volúmenes minúsculos que se manipulan.

Está reportado también que ciertos inhibidores pueden alterar su sensibilidad (etanol), lo cual debe ser tenido en cuenta durante su aplicación^[21]. La RT-PCR posee ratios menores de contaminación,

pero el alcance de los LRS a este tipo de tecnologías es muy limitado^[28]. Lo anterior pone de manifiesto que la LAMP es fácil de usar ya que no requiere de personal altamente capacitado para su implementación ni para la interpretación de resultados, lo que la convierte en una técnica amigable para el usuario (“*user-friendly*”), siendo consistentemente resaltado por diversas fuentes^[16-26,28,32,33-35].

Por robusto y rápido (“*robust and rapid*”) se advierte que una técnica debe ser capaz de soportar o superar condiciones adversas y ofrecer resultados en menos de 30 minutos. Reza Ranjbar et al^[21] destacan que pudieron identificar la cepa STEC en menos de 30 minutos utilizando *loop primers* mediante LAMP, mientras que la PCR tardó 120 minutos. Xihong Zhao et al^[20] también remarcen la utilidad de los *loops primers* en la obtención de resultados en 30 minutos, sin embargo, dejan constancia que sin el uso de éstos, la reacción se extendió a los 90 minutos y, nuevamente, 120 minutos para la PCR. Hadi Ravan et al^[24], al igual que Yukiko Hara-Kudo et al^[22], someten a ambas técnicas a la misma cantidad de tiempo pero retoman la capacidad de la LAMP de ser empleada en trabajos de campo por su bajo costo, así como también en LRS. En 2018, Y. P. Wong et al^[19] realizaron una de las más recientes revisiones de artículos donde se aplica la LAMP y sus variantes con más de 50 autores citados y definen claramente a ésta como una técnica robusta y adaptable.

Cuando se habla de una técnica “*equipment-free*” se refiere, por ejemplo, a aquellas en las que se utilizan tiras reactivas (como es el caso de la inmunocromatografía), donde no se requiere de ningún tipo de equipamiento para su implementación. Son baratas, se pueden conservar a temperatura ambiente, y su pequeño tamaño las hace fáciles de manipular y utilizar. A pesar de estos atributos positivos, no alcanzan parámetros de especificidad y sensibilidad razonables comparadas con las técnicas de biología molecular (ensayos confirmatorios)^[21-23]. Siguiendo el criterio

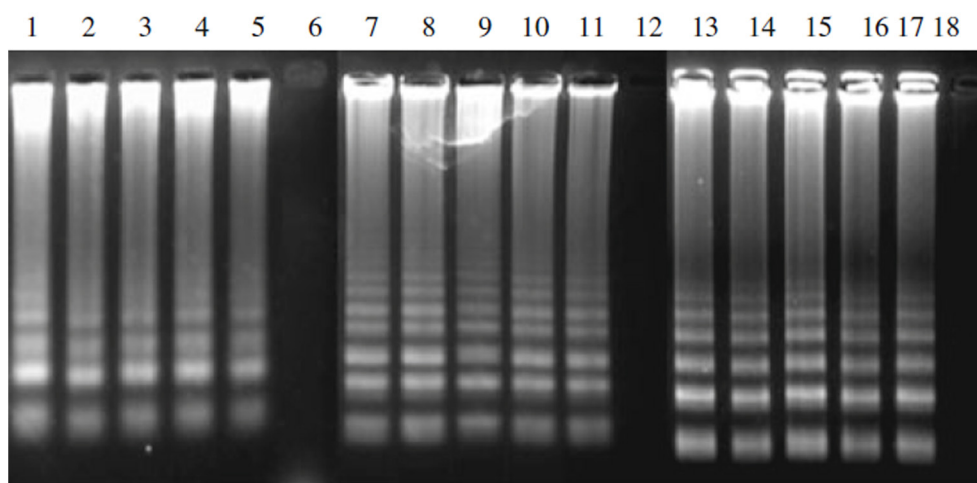


FIGURA 6. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LA LAMP EN LA DETECCIÓN DE *E. COLI* STRAIN WF21201: LINEA 1-6, 7-12, 13-18 CORRESPONDEN A ENSAYO DE LAMP SOBRE RFBE, STX1 AND STX2, RESPECTIVAMENTE. LINEA 1, 7, 13: 1 NG TEMPLADO DE DNA; LINEA 2, 8, 14: 100 PG TEMPLADO DE DNA; LINEA 3, 9, 15: 10 PG DNA; LINEA 4, 10, 16: 1 PG DNA; LINEA 5, 11, 17: 100 FG DNA; LINEA 6, 12, 18: 10 FG DNA. (EXTRAÍDO DE ZHAO X., ET AL. 2010).

propuesto, tanto la LAMP como la PCR requieren de algún tipo de instrumental, no obstante, se ha demostrado que la LAMP ha de requerir de menor y más barata aparatología que la necesaria para implementar una PCR o cualquiera de sus variantes^[17-20,25,27]. Finalmente, la notificación de caso debe ser inmediata. La LAMP permite la entrega de resultados de una manera rápida y sencilla a aquellos que lo necesitan (*"deliverable to those who need them"*) con su mera identificación visual, lo que acorta tiempos y cumple con lo establecido en los requisitos ASSURED.

Sin embargo, la LAMP requiere validación y estandarización, pero su potencial aplicabilidad y reproducibilidad debería alentar a la comunidad científica a realizar posteriores estudios comparativos y estandarización de métodos de detección.

CONCLUSIÓN

Dentro del marco de vigilancia y prevención del SUH, la implementación de la LAMP aportaría datos muy interesantes al mundo de la investigación epidemiológica, transformando los hallazgos de investigación en acciones que persigan una mejora en la prevención primaria de la población.

La notificación en tiempos récord de la presencia de la *E. coli* O157: H7 mediante la amplificación isotérmica específica del gen *rfbE* permitiría una rápida detección cualitativa de la bacteria en muestras de alimentos. Así, un resultado positivo indicaría el consecuente rechazo de un lote, así como también el diagnóstico clínico precoz con una especificidad y sensibilidad sin precedentes, además de cumplir de manera razonable lo establecido en los criterios ASSURED adoptados por la OMS dentro del marco de técnicas *point-of-care*.

Tanto en el ámbito de la industria alimenticia (control de calidad), como en estudios epidemiológicos, hospitales locales y laboratorios clínicos de mediana a baja envergadura, la LAMP ofrece la detección rápida, oportuna y confiable de los diversos patógenos bacterianos, así como virales, fúngicos y parasitológicos. En cualquier etapa de la cadena de control, la aplicación de una técnica molecular con resultados rápidos y a costos muy inferiores que los aparatos que se encuentran en centros de referencia constituyen un paso importante para la vigilancia, monitoreo y prevención del SUH.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. A. T. A. L. I. A., & Leotta, G. A.. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. 2006.
- 2- Mercado, Elsa C. Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina? Revista Argentina de Microbiología, vol. 39, núm. 4, diciembre, 2007, pp. 191-192. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- 3- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balvi, L., Garcia, B. & Griffin, P. M.. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. Foodborne Pathogens & Disease. 2006; 3(1), 88-96..

- 4- Yu, G., Niu, J., Shen, M., Shao, H., & Chen, L. Detection of *Escherichia coli* O157 using equal-length double-stranded fluorescence probe in a real-time polymerase chain reaction assay. Clinica chimica acta. 2006; 366(1-2), 281-286.
- 5- De Vigilancia, E. D. B. I. (2014). SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN ARGENTINA, 2010-2013. Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014.
- 6- SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN ARGENTINA, 2010-2013 Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014.
- 7- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., & Morita, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(6), 2895-2903.
- 8- REVISADA, Segunda Edición. Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades (MOPECE) 2011.
- 9- Hernández-Aguado, I., Lumbreras, B., & Jarrín, I. La epidemiología en la salud pública del futuro. Revista española de salud pública. 2006; 80(5), 469-474.
- 10- Boletín Integrado de Vigilancia, Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de la Salud N° 410 – SE 22 2018, Mayo de 2018. Presidencia de la Nación.
- 11- Roldán, M. L., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista argentina de microbiología. 2007; 39(2), 113-119.
- 12- Spizzirri, F. D., Rahman, R. C., Bibiloni, N., Ruscasso, J. D., & Amoreo, O. R. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. Pediatric Nephrology. 1997; 11(2), 156-160.
- 13- Kosack, C. S., Page, A. L., & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. Bulletin of the World Health Organization. 2017; 95(9), 639.
- 14- Cavero, T., & Alonso, M. Síndrome hemolítico urémico: estado actual. Medicina Clínica. 2018; 151(8), 329-335.
- 15- LaBarre, P., Boyle, D., Hawkins, K., & Weigl, B. Instrument-free nucleic acid amplification assays for global health settings. In Sensing Technologies for Global Health, Military Medicine, Disaster Response, and Environmental Monitoring; and Biometric Technology for Human Identification VIII (Vol. 8029, p. 802902). International Society for Optics and Photonics. 2011.
- 16- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. [Internet]. Sección Alimentos, Ficha técnica número 8 Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf.
- 17- USDA/FSIS. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Meat Products. Revisión MLG 5.05, 10/01/2010.
- 18- Jure, M. A., Condorí, S., Leotta, G. A., Chinen, I., Miliwebsky, E., Allori, C. & De Castillo, M. C. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

- a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. 2010.
- 19- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of applied microbiology*. 2018; 124(3), 626-643.
 - 20- Zhao, X., Li, Y., Wang, L., You, L., Xu, Z., Li, L., ... & Yang, L. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Molecular biology reports*. 2010; 37(5), 2183-2188.
 - 21- Ranjbar, R., Erfanmanesh, M., Afshar, D., Mohammadi, M., Ghaderi, O., & Haghazari, A. Visual Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Electronic physician*. 2016; 8(6), 2576.
 - 22- Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T., & Ikeda, M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56(3), 398-406.
 - 23- Ferrer, E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. 2015; 27(3), 359-371.
 - 24- Ravan, H., Amandadi, M., & Sanadgol, N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbial pathogenesis*. 2016; 91, 161-165.
 - 25- Bertrand, R., & Roig, B. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157—application to municipal wastewater. *Water research*. 2007; 41(6), 1280-1286.
 - 26- Lee, N., Baker, J., Andrews, K.T., et al., "Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria," *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(8), 2773-2778.
 - 27- Lee, N., Baker, J., Bell, D., et al., "Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests," *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(12), 4547-4549.
 - 28- Murray, C.K., Gasser Jr., R.A., Magill, A.J., et al., "Update on rapid diagnostic testing for malaria," *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(1), 97-110.
 - 29- Arroyo, M. I., Morales, G. P., Sosa, P. A., Carmona-Fonseca, J., & Maestre, A. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica:[revisión]. *Med. UIS*. 2008; 21(3), 158-175
 - 30- Dantas, V. V., Cardoso, G. V. F., Araújo, W. S. C., de Oliveira, A. C. D. S., da Silva, A. S., da Silva, J. B., ... & Lourenço, L. D. F. H. Aplicación de un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex (mPCR) para detectar fraude por substitución de cortes de carne bovina por carne de búfalo en el norte del Brasil. *CyTA: Journal of food*. 2019; 17(1), 790-795.
 - 31- Owieja, K. E., Sherrill-Mix, S., Liu, C., Song, J., Bau, H., & Bushman, F. D. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay optimized to detect multiple HIV subtypes. *PloS one*. 2015; 10(2), e0117852. doi:10.1371/journal.pone.0117852
 - 32- Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., & Álvarez, E. E. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista argentina de microbiología*, 2006; 38(1), 38-40.
 - 33- Chiluisa-Utreras, V. P., Cabrera-Rodríguez, M. A., & Valladares-Torres, P. K. Detección de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. *Respuestas*. 2017; 22(2), 67-75.
 - 34- Malucelli, G et al. Extracción de biomacromoléculas de tejidos vegetales para su aplicación en el campo de los retardadores del fuego (Doctoral dissertation, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO). 2016.
 - 35- Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakada, A., Okatani, A. T., Horikita, T., & Hayashidani, H. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*, 2004; 42(11), 5349-5352.

ACETATO DE GLATIRAMER: COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE CONTROL DE CALIDAD EN PRODUCTOS COMERCIALIZADOS EN ARGENTINA

Glatiramer acetate: comparison of quality control methodologies in products commercialized in Argentina

Sofía Bampi^a, Lucía Bitonte^a, M. Victoria Cid^a, Karla Freire^a, Ailen García^a, Gastón Mariani^a, Dante Navalesi^a, Emilia Ojeda Zachara^a, Facundo Taborda^a, Regina Zaccardo^a, Yanina Rodríguez^b, Matías Gómez^b.

^a *Integrantes de la Residencia en Control de Calidad de Medicamentos.*

^b *Revisores técnicos e institucionales del artículo.*

Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, Instituto Nacional de Medicamentos.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Buenos Aires, Argentina.

Contacto: regina.zaccardo@anmat.gob.ar

* *Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo del trabajo.*

Recibido: 23 de junio de 2020. Aprobado: 09 de diciembre de 2020.

RESUMEN

El acetato de glatiramer es un péptido sintético comprendido dentro del grupo de drogas complejas no biológicas y está indicado como inmunomodulador para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Actualmente, se encuentran en el mercado nacional tres productos comercializados que contienen acetato de glatiramer como principio activo, todos ellos en la forma farmacéutica solución inyectable. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento de los ensayos realizados en el control de calidad de los mismos. Para ello, se exploró la base de datos de trámites de registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y se realizó una búsqueda bibliográfica respecto a la temática. Tras analizar los diferentes métodos de control, se verificó que todos los laboratorios titulares efectúan ensayos generales para la forma solución inyectable mientras que, respecto a los análisis relacionados exclusivamente con la naturaleza del ingrediente farmacéutico activo, se observaron diferencias en los tipos de ensayos a realizar. Esto plantea el desafío de armonizar y definir aquellos ensayos obligatorios en el control de calidad de esta clase de medicamentos. Los antecedentes de registro de los productos actualmente comercializados son una herramienta sumamente útil para tal propósito. Este relevamiento crea un escenario que permite proyectar y trabajar para aunar y definir especificaciones y requisitos técnicos mínimos a considerarse necesarios.

Palabras clave: acetato de glatiramer, inmunomodulador, péptido sintético, control de calidad.

ABSTRACT

Glatiramer acetate is a synthetic peptide within the group of non-biological complex drugs, and it is indicated as an immunomodulator for the treatment of multiple sclerosis. Currently, there are three products which are commercialized in the national market that contain glatiramer acetate as the active ingredient, all of them in the form of pharmaceutical injectable solution. The objective of this work is to perform a survey of the tests carried out in their quality control. For this purpose, the database of registration procedures of the National Administration of Medicines, Food and Medical Technology was explored, and a bibliographic search on the subject was carried out as well. After analyzing the different control methods, it was shown that all the owning laboratories carry out general tests for the injectable solution form, while in relation to the analyses related exclusively to the nature of the active pharmaceutical ingredient, some differences were observed in the tests to be carried out. The challenge then remains to define the tests that should be mandatory in the quality control of these products. The registration records of the currently marketed products are an extremely useful tool for this purpose. This survey creates a scenario that allows to project and work to combine and define the specifications and minimum technical requirements to be considered necessary.

Keywords: glatiramer acetate, immunomodulator, synthetic peptide, quality control.

INTRODUCCIÓN

El acetato de glatiramer o glatiramer (AG), nº de CAS 147245-92-9, es una mezcla de sales de copolímeros sintéticos formados por cuatro aminoácidos naturales: L- alanina, L- lisina, L- glutámico y L- tirosina (Figura 1), en una relación molar constante de 0,43: 0,34: 0,14: 0,09. Los péptidos de esta mezcla heterogénea varían en secuencia y longitud, lo que determina que cada una presenta diferentes pesos moleculares y propiedades fisicoquímicas^[1,2]. Sin embargo, la distribución del tamaño de estos copolímeros es estrecha respecto de otros productos de síntesis, los cuales se desarrollan a partir del acoplamiento de los monómeros constituyentes. En este sentido, el peso molecular promedio varía entre 5 a 9 kDa (kilodaltons)^[1-3].

El AG forma parte del grupo de drogas complejas no biológicas (*Non Biological Complex Drugs*, NB CD)^[2]. En estos casos, como también ocurre con los principios activos de origen biológico, la calidad depende considerablemente del proceso de elaboración^[3]. Estas NB CD se caracterizan por estar constituidas por varias moléculas estrechamente relacionadas que no se pueden aislar, cuantificar, caracterizar o describir por completo mediante ensayos analíticos fisicoquímicos convencionales^[4].

Inicialmente los productos polipeptídicos terapéuticos eran considerados en su totalidad, bajo la definición contemplada en la Disposición ANMAT 7075/2011, como productos biológicos. Actualmente, se distingue a los péptidos terapéuticos sintéticos de aquellos obtenidos por métodos de ADN recombinante o extracción/obtención a partir de un ser vivo, adjudicado principalmente a la diferencia de sus tamaños, y a que los primeros pueden tener estructuras químicas que no llegan a darse usualmente en péptidos y proteínas. Esas cualidades posibilitan una caracterización de su estructura con una adecuada batería de ensayos fisicoquímicos^[5,6].

Las propiedades fisicoquímicas de los materiales de partida y el esquema de reacción son fundamentales para determinar que las secuencias de los péptidos sintéticos no sean completamente al azar. Sin embargo, aunque el proceso se encuentre estrictamente controlado, existen variaciones, lote a lote, en la estructura primaria de los copolímeros. Por este motivo es que se conoce al conjunto de todos estos péptidos como glatiramoides^[1].

El mecanismo de acción del acetato de glatiramer (conocido también como copolímero 1) todavía no está completamente dilucidado, pero se cree que actuaría modulando la respuesta

innata y adaptativa del sistema inmunitario ocasionando una acción antiinflamatoria y neuroprotectora^[7,8].

Por su composición similar a la proteína básica de la mielina, el AG se diseñó inicialmente para inducir encefalomiелitis autoinmune experimental, como modelo animal de la esclerosis múltiple. Sin embargo, los estudios en animales demostraron su eficacia para prevenir y suprimir esta enfermedad^[9].

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria crónica mediada por el sistema inmune que afecta al sistema nervioso central generando una alteración en la capacidad para conducir los impulsos eléctricos^[10-12]. El diagnóstico de esta enfermedad autoinmune^[12,13] se basa en la evaluación clínica, imágenes de las “placas escleromatosas” mediante resonancia magnética y pruebas complementarias^[13]. Por otra parte, el tratamiento farmacológico puede dividirse en tres categorías: tratamiento de los brotes, sintomatológico y modificador de la enfermedad. Dentro de este último grupo, que intenta reducir el número de brotes y retrasar la evolución de la enfermedad, se encuentra el AG, el cual pertenece a la familia de los inmunomoduladores. En particular, suele reservarse su uso para la esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR)^[10-14].

En el ámbito internacional, el primer medicamento conteniendo AG fue aprobado para su comercialización en el año 1996 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA), para reducir la frecuencia de las recaídas en pacientes con EMRR^[15]. La presentación registrada fue una inyección subcutánea de 20 mg/mL. Por su parte, en Europa, la aprobación fue obtenida a principios de los años 2000, inicialmente en el Reino Unido, para luego extenderse a otros países de la Unión Europea^[16]. En Argentina, el primer producto con AG como principio activo obtuvo la autorización de registro por parte de la ANMAT en el año 1997. Posteriormente, se aprobaron ampliaciones en las indicaciones por las tres agencias reguladoras mencionadas^[17,18]. Tanto en el ámbito nacional como internacional, debieron pasar más de 10 años para que se aprobaran productos de un origen diferente al innovador con AG de 20 mg/mL^[19-21]. En el caso de Estados Unidos, la aprobación por parte de FDA se realizó basada en una exhaustiva caracterización funcional y estructural del péptido, pero no se realizaron ensayos clínicos^[22]. La situación fue distinta en Europa, donde la agencia reguladora europea (*European Medicines Agency*, EMA) además solicitó, para la aprobación del similar de 20 mg/ml, la demostración

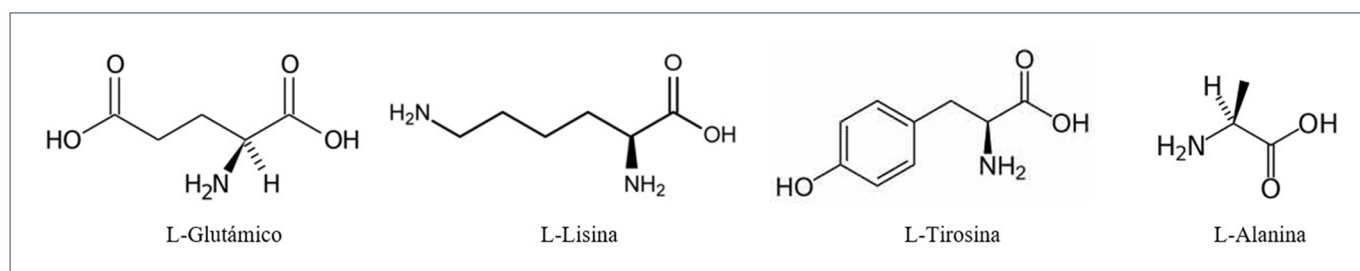


FIGURA 1. AMINOÁCIDOS CONSTITUYENTES DE LOS PÉPTIDOS DE GLATIRAMER.

de equivalencia terapéutica *in vivo*^[23]. Cuando el laboratorio multifuente decidió ampliar la concentración a 40 mg/mL, la misma se aprobó realizando una estrategia comparativa tipo puente, basada en el estudio clínico de la dosis de 20 mg/mL del innovador y del propuesto, la comparación de calidad *in vitro* entre ambas dosis del multifuente y entre las concentraciones de 40 mg/mL de ambas firmas^[3,24,25].

Al igual que en el caso de las agencias reguladoras FDA y EMA, los productos conteniendo AG aprobados por la ANMAT, se encuentran en la forma farmacéutica solución inyectable, de aplicación subcutánea, en una presentación de jeringa prellenada de 1 mL y en concentraciones de 20 y 40 mg/mL.

En la **Figura 2** se expone, en orden cronológico, los hitos respecto a las autorizaciones por las diferentes agencias regulatorias.

Actualmente no se encuentra codificada la metodología de control de calidad del principio activo AG ni del producto terminado AG inyectable en Farmacopea Argentina ni en farmacopeas internacionalmente reconocidas. Con el objetivo de relevar los ensayos que son aplicables a este producto terminado inyectable, se realizó una comparación de las técnicas de control de calidad de los tres laboratorios que comercializan, al momento, esta especialidad medicinal en Argentina.

Para relevar la información se exploró la base de datos de trámites de registro de la ANMAT enfocado en los ensayos y las metodologías de control empleadas por cada laboratorio titular de la especialidad medicinal. Adicionalmente, para el análisis posterior, también se consultó bibliografía acerca de los productos de AG aprobados en diferentes países y las diferentes metodologías utilizadas en su caracterización o comparación frente al innovador.

Comparación de las metodologías de control de calidad del producto terminado

Del relevamiento realizado surgen los siguientes ítems a resaltar respecto a los ensayos físico-químicos y farmacotécnicos:

- 1- Aspecto: se debe determinar el color, la claridad y la ausencia de partículas extrañas. Dos de los laboratorios realizan la determinación del color mediante comparación visual con soluciones de referencia, mientras que el otro lo efectúa por inspección visual. Respecto a la opalescencia, uno de ellos efectúa la evaluación por comparación con preparaciones de referencia.
- 2- pH: Determinación potenciométrica en todos los casos con rangos comprendidos entre 5,5-7,0.
- 3- Partículas subvisibles: En los tres casos se siguen las mismas recomendaciones indicadas en el capítulo "Partículas en inyectables" de la Farmacopea Argentina 7ma Edición, respetando las especificaciones para un volumen menor a 100 mL, es decir, menos de 6000 partículas iguales o mayores a 10 µm y menos de 600 partículas iguales o mayores a 25 µm por unidad.
- 4- Volumen extraíble: Se calcula considerando la densidad de la solución y la masa del contenido de cada jeringa prellenada analizada. Uno de los laboratorios realiza la determinación como control de proceso.
- 5- Identificación: un laboratorio utiliza cromatografía en capa delgada (TLC), otro laboratorio realiza el ensayo por espectrofotometría ultravioleta (UV) y el restante utiliza cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) en simultáneo con la valoración.
- 6- Valoración: Dos de los productos son analizados por HPLC, uno aplicando el fundamento de exclusión molecular y el otro de intercambio iónico. El tercero emplea espectrofotometría UV.

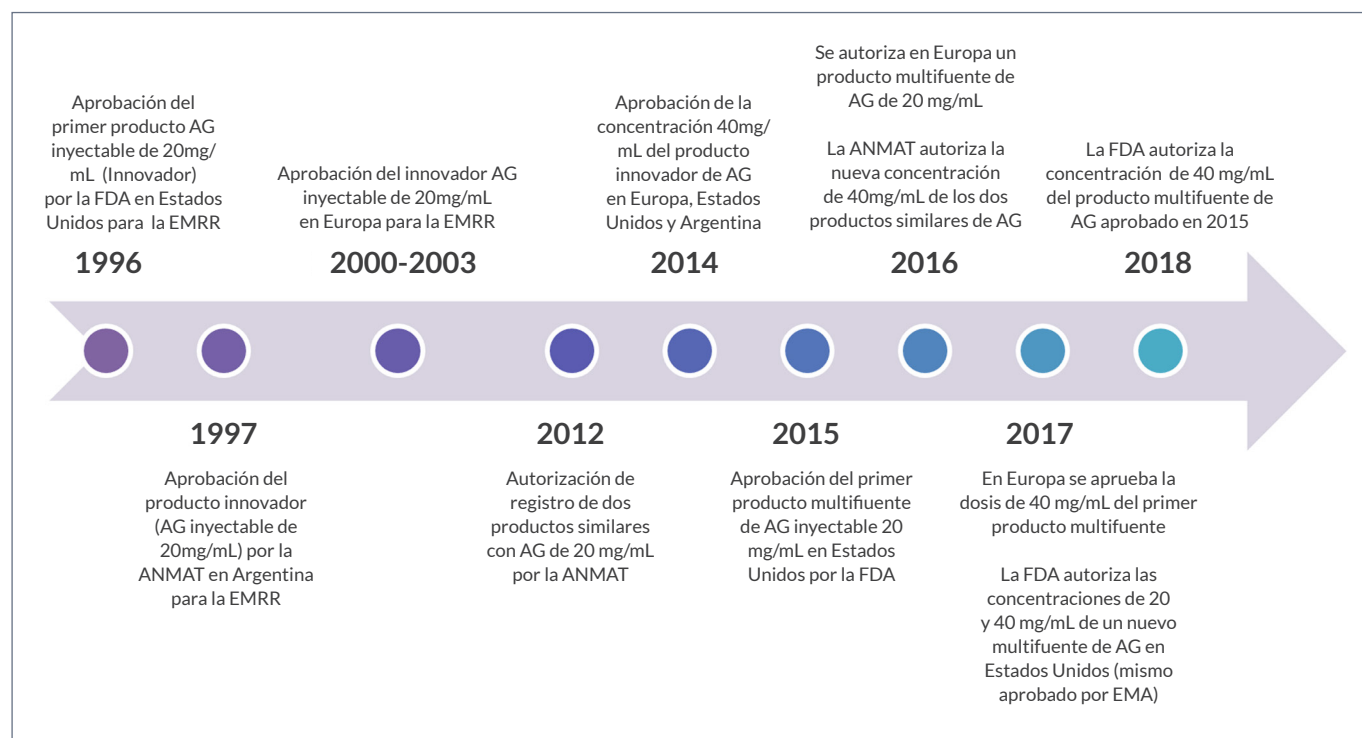


FIGURA 2. LÍNEA DE TIEMPO QUE EVIDENCIA LAS AUTORIZACIONES A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL DE LAS ESPECIALIDADES MEDICINALES CON AG.

El contenido de AG debe estar comprendido entre el 90,0% y el 110,0% del valor declarado en el rótulo.

7- Distribución de peso molecular: Los productos no presentan un peso molecular único, sino que poseen una distribución condicionada por las cadenas de polímeros de longitud variable (son polidispersos). Para esta determinación se utiliza la técnica de exclusión molecular (SEC), conocida generalmente como cromatografía por permeación en gel (GPC) cuando es aplicada a polímeros. Sólo dos laboratorios emplean esta cromatografía para el análisis sobre el producto terminado; pero difieren en el tipo de detector, en un caso se utiliza un detector de índice de refracción mientras que en el otro se utiliza un detector ultravioleta.

8- Composición de aminoácidos: Sólo un laboratorio aplica este ensayo en el producto terminado. La determinación se realiza por HPLC en fase reversa con detector de fluorescencia previa hidrólisis y derivatización de la muestra.

9- Determinación de aminoácidos libres: Este ensayo se realiza aplicando una separación por HPLC en fase reversa con detector de aerosol cargado. Sólo uno de los laboratorios estableció su aplicación sobre el producto terminado

10- Impurezas: Cada laboratorio realiza un método propio de cromatografía. Uno de ellos no realiza este ensayo sobre el producto terminado, aplicándolo en la materia prima de AG.

11- Contenido de ácido acético: este compuesto es el que participa en la confección de las sales de los copolímeros. Su presencia se determina por HPLC siguiendo las recomendaciones de la monografía de esta sustancia en farmacopeas. Uno de los laboratorios lo realiza en el control del producto terminado.

A continuación, en la **Figura 3**, se muestra que, a pesar que los ensayos específicos para la formulación con AG no están codificados, todos los laboratorios coinciden en los ensayos principales de caracterización e identificación.

En lo que respecta a los ensayos microbiológicos, por tratarse de un producto inyectable, las tres metodologías incluyen el ensayo de esterilidad y de endotoxinas bacterianas, basándose en las especificaciones y recomendaciones que las farmacopeas explicitan para esta forma farmacéutica.

En el proceso de registro de estos productos, se realizan extensas caracterizaciones que incluyen además de los aspectos físicoquímicos y microbiológicos, ensayos de caracterización biológica que ayudan a establecer un perfil o identidad antigénica, que se encuentra completamente ligada a su mecanismo de acción. Las técnicas de control de producto terminado tienen como objetivo principal asegurar la homogeneidad entre lotes y la inalterabilidad de los mismos respecto al aprobado por las autoridades regulatorias, siempre que se mantengan, a su vez, los procesos productivos. De esta forma, metodologías más exhaustivas permiten una mejor caracterización y, en consecuencia, mayor seguridad respecto al producto liberado.

Teniendo en cuenta esta premisa y basándose en la bibliografía consultada, se recomienda la aplicación de técnicas que proporcionen información adicional acerca de la estructura primaria de los péptidos al determinar el perfil de cargas de la mezcla. La electroforesis de enfoque isoeléctrico capilar (IEF) es una técnica que cumple con esta proposición y permite detectar variaciones entre lotes de glatiramoides producidos

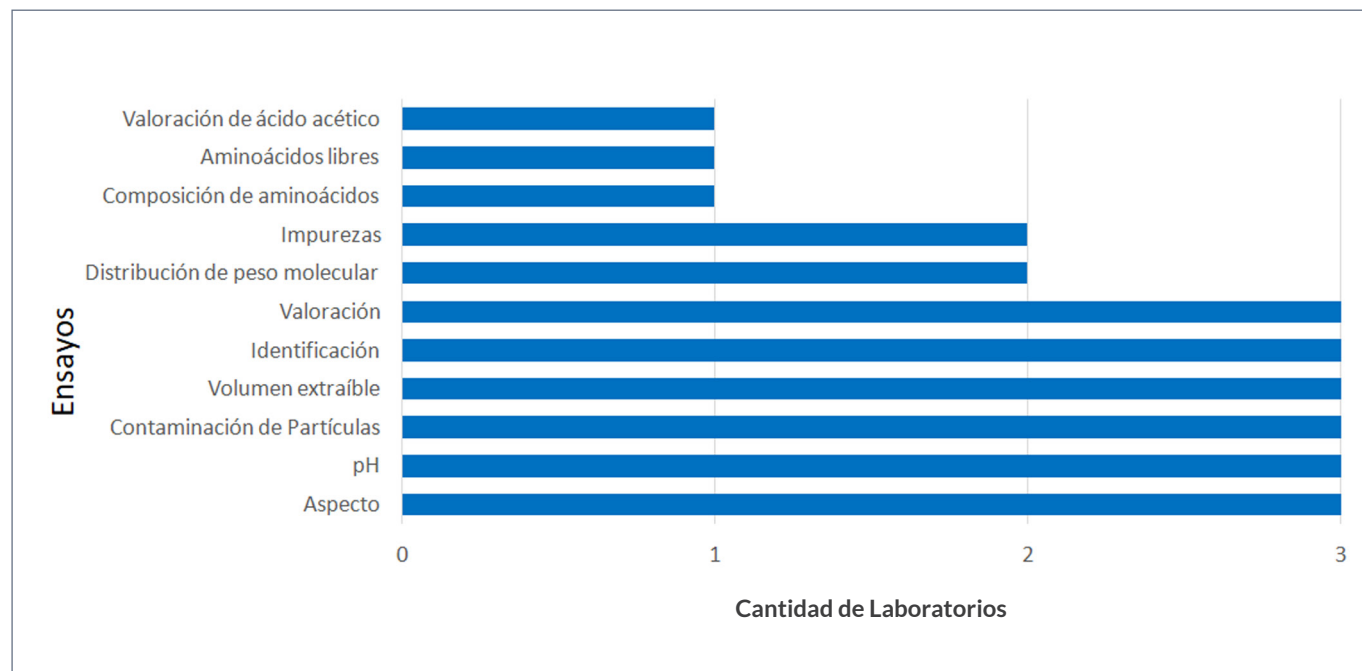


FIGURA 3. COMPARACIÓN DE LOS ENSAYOS FÍSICO-QUÍMICOS Y FARMACOTÉCNICOS REALIZADOS SOBRE LOS PRODUCTOS TERMINADOS EVALUADOS.

por diferentes procesos de fabricación, lo que permite un mejor control del producto^[2]. De manera análoga, la cromatografía de intercambio iónico, basada en una separación no destructiva de la mezcla de polipéptidos según la intensidad de la carga superficial de sus componentes, permitiría obtener perfiles de las subpoblaciones de polipéptidos en base a su carga, reflejando desde las características de composición de la mezcla hasta las estructuras primarias de los péptidos. Esta distribución de cargas es considerada uno de los atributos clave que afectaría las propiedades de unión de los antígenos mediante las células presentadoras de antígenos a las células T, por lo que impactarían en la respuesta inmunológica al producto y, en consecuencia, en la potencia y acción de AG en el individuo^[26]. Otra técnica que contribuye a evidenciar la identidad antigénica de las estructuras poliméricas es la de reconocimiento específico del AG utilizando anticuerpos monoclonales y/o policlonales mediante un inmunoensayo adecuado^[26].

Estas recomendaciones para los protocolos de liberación de lotes lograrían un control más sofisticado del proceso productivo y permitiría delinear un mejor seguimiento de las estructuras de esta mezcla de péptidos sintéticos.

La bibliografía consultada coincide en concluir que los análisis de los fragmentos de los péptidos por escisión química o enzimática no son lo suficientemente sensibles como para discriminar variaciones en la composición de los copolímeros de AG, por lo que no contribuiría al control lote a lote del producto^[2,3].

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En base a la información obtenida respecto de la documentación evaluada, se puede destacar que, si bien actualmente no se encuentra la monografía compendiada del producto terminado AG inyectable en la Farmacopea Argentina ni en aquellas internacionalmente reconocidas, los laboratorios efectúan ensayos que permiten evidenciar condiciones adecuadas de calidad, seguridad y eficacia. Desde este punto de vista, las metodologías establecidas por los tres laboratorios, incluyen ensayos necesarios para poder identificar, valorar y caracterizar un producto en sus rasgos fisicoquímicos, farmacotécnicos y microbiológicos. Las determinaciones de estos dos últimos aspectos son realizadas en los tres productos comparados, esencialmente de manera similar, y son las consideradas indispensables para una forma farmacéutica inyectable. Respecto a los ensayos físico-químicos, si bien los laboratorios difieren en algunas de las técnicas empleadas o en la instancia de su realización, todas permiten obtener información concreta y relevante a la hora de realizar el control de calidad de un producto de administración parenteral. En este punto, es importante destacar que se están comenzando a redactar, tanto en la Farmacopea Europea como en la de los Estados Unidos, documentos borradores (*drafts*) de monografías de AG^[27,28].

Si bien los requerimientos necesarios al momento de registro de productos de AG, de su comparabilidad frente al producto innovador o de liberación de lotes son establecidos por cada agencia regulatoria, éstas coinciden en la importancia de

evaluar aspectos fisicoquímicos relacionados a los parámetros de distribución de peso molecular. El AG al ser una mezcla polipeptídica compleja, se puede caracterizar mediante metodologías de distribución de peso molecular que reflejen la distribución general de los polipéptidos en la mezcla compleja, según su tamaño y abundancia relativa; y metodologías consideradas de alta resolución que aborden una caracterización conformacional integral como el uso de sistemas GPC/SEC de detectores múltiples^[26]. Los parámetros de peso molecular y distribución (Mn, Mw, Mz), radio hidrodinámico (Hr, que caracteriza el tamaño efectivo medio de los péptidos), viscosidad intrínseca (IV; la contribución de los péptidos a la viscosidad global de la solución, inversa de la densidad molecular) y polidispersidad (Pd; una medida de la uniformidad de la mezcla de polipéptidos con respecto a la distribución del peso molecular) serán propios de la mezcla polipeptídica característica de cada producto^[26].

La evaluación realizada en este trabajo se enfoca en el producto terminado AG inyectable. En este punto, cabe aclarar que ciertas determinaciones del principio activo, como la composición de aminoácidos, pueden realizarse en la instancia de control de materia prima.

Si bien se requieren más estudios para establecer las relaciones entre diferencias fisicoquímicas propias de los diferentes productos, y la eficacia terapéutica, no deja de ser un asunto a tener en cuenta para la correcta caracterización del producto de AG.

El relevamiento realizado refleja la situación actual en Argentina en relación al control de calidad del producto AG inyectable y crea un escenario desde donde es posible proyectar propuestas para acotar especificaciones e incluir requisitos técnicos adicionales. Esto permitiría mejorar la caracterización de esta formulación con NBCD, optimizando la fiscalización acorde a los objetivos de la ANMAT en favor de la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Varkony H, Weinstein V, Klinger E, Sterling J, Cooperman H, Komlosch T et al. The glatiramoid class of immunomodulatory drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(4):657-68.
- 2- Vera Weinstein, Rivka Schwartz, Iris Grossman, Benjamin Zeskind and J. Michael Nicholas. Glatiramoids. En Daan J.A. Crommelin Jon S. B. de Vlieger. *Non-Biological Complex Drugs*. Springer. Switzerland; 2015;p.107-148.
- 3- P. Rocca, I. Eberinib, U.M. Musazzia, S. Franzèa, P. Minghettia, Minghetti et al. Glatiramer acetate: A complex drug beyond biologics. *Eur J Pharm Sci*. 2019 May 15; 133:8-14.
- 4- Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide Therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 2015 Jan;20(1):122-8.
- 5- S. Bampi, L. Bitonte, M.V. Cid, G. Mariani, E. Ojeda Zachara, M. Baldut et al. Péptidos Sintéticos: Actualización. Próximos Desafíos Desde El Enfoque Regulatorio. *Revista Ciencia Reguladora*. 2019; Ed :21-27.
- 6-European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Technical Guide for the elaboration of monographs on synthetic peptides and recombinant DNA proteins. 2nd Revision, Edition 2018.

- 7- T. Prod'homme, S.S. Zamvil. The Evolving Mechanisms of Action of Glatiramer Acetate. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2019; 1;9(2).
- 8-Aharoni R. The mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and beyond.Autoimmun.2013; 12 (5): 543-53.
- 9- M. Caporro, G. Disanto, C. Gobbi, C. Zecca. Two Decades Of Subcutaneous Glatiramer Acetate Injection: current role of the standard dose, and new high dose low frequency glatiramer acetat in relapsing-remitting multiple sclerosis treatment. Patient Prefer, Adherence. 2014; 8: 1123-1134.
- 10- National Institute of Neurological Disorders and Strokes [Internet]. Estados Unidos: NINDS; 2005 [actualizado 07 de enero del 2020, citado el 20 de abril del 2020] Disponible en: https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Hope-Through-Research/Multiple-Sclerosis-Hope-Through-Research#3215_2.
- 11- Multiple Sclerosis International Federation [Internet]. Gran Bretaña: NINDS; 2012 [actualizado 15 de mayo del 2019, citado el 20 de abril del 2020] Disponible en: <https://www.msif.org/>.
- 12-Mohamed Koriem, KM. Correction Corrigendum To 'Multiple Sclerosis: New insights and trends'. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.2017; 7 (5), 493-504.
- 13- J.I. Rojas, L. Patrucco, E. Cristiano. Evaluación Clínica Y Por Imágenes De La Esclerosis Múltiple Progresiva. Medicina. 2019; 79: 37-43.
- 14- M.C. Martinez-Altarriba, O. Ramos-Campoy, I.M. Luna-Calca, E. Arrieta-Antón. Revisión de la esclerosis múltiple (2). Diagnóstico y tratamiento. Semergen. 2015; 41(6):324-328.
- 15- U.S.Food and Drug Administration-Approved Drugs [Internet]. Estados Unidos: FDA; 2000 [actualizado 5 de mayo del 2020, citado el 5 de mayo del 2020]. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=020622>
- 16- Teva Pharmaceutical Industries Ltd.-Comunicado de prensa [Internet]. Estado Unidos: Teva [actualizado el en 2020, citado el 5 de mayo del 2020] Disponible en: <https://ir.tevapharm.com/news-and-events/press-releases/press-release-details/2000/Teva-Received-Marketing-Approval-for-Copaxone-in-the-UK/default.aspx>.
- 17- B. Weinstock-Guttman, KV Nair, JL Glajch, TC Ganguly, D Kantor. Two Decades Of glatiramer acetate: From initial disco very to the current development of generics. J Neurol Sci.2017 15; 376:255-259.
- 18- Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation [Internet]. Reino Unido: ACNR;2002 [actualizado el 03 de marzo del 2018, citado el 5 de mayo del 2020] Disponible en:<https://www.acnr.co.uk/2015/08/new-copaxone-glatiramer-acetate-formulation-launched-in-uk/>.
- 19- U.S. Food and Drug Administration-ANDA Approval [Internet]. ANDA 206936 Approval Letter - [Glatiramer Acetate Injection 40 mg/mL] Mylan Pharmaceuticals. Estados Unidos: FDA; 03 de octubre 2017 [citado el 7 de mayo de 2020] Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2017/206936Orig1s000ltr.pdf
- 20- U.S. Food and Drug Administration-ANDA Approval [Internet]. ANDA 091646 Approval Letter - [Glatiramer Acetate Injection 20 mg/mL] Mylan Pharmaceuticals. Estados Unidos: FDA; 03 de octubre 2017 [citado el 7 de mayo de 2020] Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2017/091646Orig1s000ltr.pdf
- 21- U.S. Food and Drug Administration-ANDA Approval [Internet]. ANDA 206921 ApprovalLetter - [Glatopa (GlatiramerAcetate) Injection, 40 mg/mL] Sandoz. Estados Unidos: FDA; 12 febrero 2018 [citado el 7 de mayo de 2020] Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2018/206921Orig1s000ltr.pdf
- 22- C. Bell, J. Anderson, T. Ganguly, J. Prescott, I. Capila, J.C. Lansing, R. Sachleben, M. Iyer, I. Fier, J. Roach, K. Storey, P. Miller, S. Hall, D. Kantor, B.M. Greenberg, K. Nair, J.Glajch. Development of Glatopa® (GlatiramerAcetate): The First FDA-Approved Generic Disease-Modifying Therapy for Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. J PharmPract. 2018 Oct; 31(5): 481-488.
- 23- Synthon - Press Releases. [Internet] Synthon obtains approval for glatiramer acetate 20 mg/mL in Europe. [comunicado de prensa del 12 de abril de 2016, citado el 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.synthon.com/press-releases/synthon-obtains-approval-glatiramer-acetate-20-mgml-europe>
- 24- Arends RJ, Wang D, Buurman M, Luten J, Koper NP, Wolf C, Scheren M. Comparison of Copaxone® and Synthon's therapeutically equivalent glatiramer acetate. Pharmazie. 2019 Aug 1;74(8):449-461.
- 25- Synthon - Press Releases. [Internet] Regulatory Approval in Europe granted for Synthon's glatiramer acetate 40 mg/ml. [comunicado de prensa del 5 de octubre de 2017, citado el 11 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.synthon.com/press-releases/regulatory-approval-europe-granted-synthons-glatiramer-acetate-40-mgml-1>
- 26-Komlos A., Weinstein V., Loupe P., Hasson T., Timan B., Konya A., Alexander J., Melamed-Gal S., Nock S. Physicochemical and Biological Examination of Two Glatiramer Acetate Products. Biomedicines. 2019;7(3):49
- 27- European Directorate for the Quality of Medicines. Knowledge Database.: [citado el 14 de Junio de 2020] Disponible en: https://extranet.edqm.eu/publications/recherches_sw.shtml. Búsqueda realizada "glatiramer"
- 28- USP, 2019. Glatiramer Expert Panel of Biologic Monographs 1 – Peptides and Insulins Expert Committee (October 16–17, 2017). Agenda (Draft). [citado el 14 de Junio de 2020] Disponible en: https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/expert-committees/2017-10-1617_glatiramer_ep_f2f_agenda.pdf.

Reglamento para Autores

Versión 5

Revista Científica ANMAT

Organismo Editor: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

CONDICIONES PARA PUBLICAR

Importante: Los manuscritos que se envíen no deben haberse remitido a otra revista ni encontrarse en proceso de dictamen editorial simultáneamente. El autor deberá remitir firmada la declaración de autoría y compromiso, así como el permiso de publicación en caso que el artículo sea aceptado.

La responsabilidad por el contenido de los artículos es de los autores.

Una vez aceptado el artículo para su publicación, el Editor se reserva el derecho a realizar modificaciones de estilo a fin de mejorar su comprensión, pero sin afectar su contenido intelectual. Los artículos que previamente hayan sido difundidos a través de la web externa de ANMAT o por otros medios externos, no serán aceptados para su publicación en la revista.

Los manuscritos deberán enviarse en formato digital a las siguientes direcciones de correo electrónico: revista@anmat.gob.ar / revistacranmat@gmail.com

Alcance temático: la revista admite para su publicación textos de investigación u opinión vinculados a cualquier aspecto científico regulatorio.

Tipos de publicaciones científicas y clasificación (aceptados por esta revista)

1. Publicaciones primarias

Se denominan así a aquellas publicaciones que recopilan datos primarios a partir de una investigación experimental u observacional. Dentro de este grupo se incluyen:

Artículo Original Experimental: publicación científica del conocimiento nuevo por excelencia que se constituye como el producto final de una investigación experimental. Se busca establecer asociación estadística entre variables en estudio. La estructura de este tipo de artículos sigue la forma IMRyD, esto significa que incluye: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión (puede contener la sección Conclusiones). También debe constar de un Título, Nombre y Filiación de los autores, Resumen en español e inglés (*Abstract*) y Referencias bibliográficas.

Artículo Original Observacional: recopila datos de manera sistemática a partir de la observación de hechos de la realidad en los que el investigador no tiene ningún control. Este tipo de artículos incluye a los estudios transversales, estudios de casos y controles y estudios de cohorte. Requiere un análisis estadístico correspondiente y su estructura sigue el mismo patrón (IMRyD) que el Artículo Original Experimental.

Reporte de caso o serie de casos: se basa en la descripción de casos o problemáticas específicas que por su trascendencia o complejidad brindan información importante a pares, o sirven como base para establecer nuevos estudios. Estos artículos **no** siguen una estructura IMRyD. Ejemplos de este tipo de estudios

incluyen la descripción de un evento adverso inesperado en un paciente, resultados originales a partir del análisis de una muestra o producto, hallazgos novedosos a partir de una tarea de fiscalización, etc.

2. Publicaciones secundarias

Son aquellas que se basan explícitamente en publicaciones primarias o en las que se analizan datos recopilados de manera sistemática con otro fin. Dentro de este grupo quedan incluidos:

Revisión sistemática: Resume los resultados de los estudios disponibles y cuidadosamente diseñados, proporciona un alto nivel de evidencia sobre la eficacia de las intervenciones en temas de salud. Para ello se lleva a cabo una selección de publicaciones de un tema específico y se analiza la información presentando discusión y conclusiones. Se debe describir claramente los criterios de búsqueda y de inclusión/exclusión de los estudios. Sigue la misma estructura IMRyD.

Este tipo de publicación puede incluir un meta-análisis, un tipo de estudio basado en la integración sistemática, a través de técnicas estadísticas, de información obtenida en publicaciones previas.

Revisión bibliográfica o narrativa: se trata de un tipo de revisión temática o monográfica que aborda un tema específico. A diferencia de la revisión sistemática no se explicita la búsqueda y selección de publicaciones, se considera una actualización del tópico. La estructura de este tipo de artículos **no** sigue la estructura IMRyD aunque debe contener mínimamente una introducción sobre el tema, desarrollo, discusión y/o conclusiones.

Artículo de opinión o Enfoque regulatorio: se trata de una revisión temática en la que el autor toma una posición frente a un tema específico. En los casos en que se trata de una posición institucional definida sobre un tópico de interés regulatorio se lo denomina "Enfoque regulatorio". En los casos en que se expresa la posición de un autor en particular o de un grupo de investigación se lo denomina "Artículo de opinión". La estructura de este tipo de artículos **no** sigue la estructura IMRyD y debe contener mínimamente una introducción sobre el tema, desarrollo, discusión y/o conclusiones.

Estado de situación: este tipo de artículo tiene como finalidad presentar datos y/o información sistematizada y analizada, recogida a partir de bases de datos u otra fuente de información confiable. La información suele presentarse en forma de tablas y/o gráficos y, a menudo, incluye un análisis estadístico de tipo poblacional.

Su estructura sigue un patrón IMRyD descripto previamente y se aconseja incluir una sección (discusión) en las que se haga un análisis sobre la información presentada (por ej. uso de líneas de tendencia a distintos tiempos, análisis comparativo con datos nacionales y/o internacionales, etc.).

3. Otros tipos de artículos

Carta al editor: se trata de comunicaciones cortas, en general, con comentarios en desacuerdo o acuerdo conceptual, metodológico, interpretativo, de contenido, etc., sobre algún artículo original, de revisión, editorial u otro formato de publicación publicado previamente en una revista.

Se podrán admitir nuevas secciones previa evaluación por parte del Comité Editor.

Presentación de los textos (generalidades). Los manuscritos deben presentarse en formato Word, con fuente *Times New Roman*, 12 pts., interlineado sencillo.

Los elementos gráficos (tablas y figuras) deberán, además, ser enviados en sus archivos originales (Excel, jpg, etc) y, en todos los casos, deberán ser citados en el texto e indicar su título al pie. Todos los ejes de cada gráfico deben indicar título y unidades.

Las palabras en idioma diferente del castellano deberán estar en cursiva.

Ética. Si las fotografías empleadas son de personas deberán respetar los principios de privacidad y contar con autorización escrita para su publicación. Además, se deberán considerar los aspectos éticos relacionados con humanos o animales en los casos que se justifique.

Declaración de conflictos de intereses. Deberá incorporarse sólo si fuera necesario.

Aspectos no contemplados en el presente reglamento serán indicados a través de guías específicas según el tipo de artículo o deberán ser consultados con el Comité Editorial.

Bibliografía. Las citas bibliográficas deberán seguir las normas Vancouver y, además, reunir los "Requisitos de uniformidad para escritos de ICMJE". Disponible en: <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>

Palabras claves. Utilizar el DeCS – Descriptores en Ciencias de la Salud – en español e inglés. Disponible en: <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>

ESTRUCTURA Y EXTENSIÓN CONVENCIONAL (ORIENTATIVA) DE LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS*

(Los números que se muestran son orientativos)

Tipo	Extensión** (nº de palabras)	Resumen (nº de palabras)	Nº de referencias bibliográficas	Nº total de cuadros y/o figuras
Artículo Original Experimental	Mínimo 2800	200-300	Mínimo 15	Mínimo 5
Artículo Original Observacional	Mínimo 2800	200-300	Mínimo 15	Mínimo 5
Reporte de caso	Mínimo 1500	100-150	Mínimo 3	Variable
Revisión sistemática	Mínimo 2800	200-300	Mínimo 20	Mínimo 3
Revisión bibliográfica	Mínimo 2500	200-300	Mínimo 15	Mínimo 3
Artículo de opinión o enfoque regulatorio	2000	200-300	Mínimo 10	Variable
Estado de situación	Mínimo 1500	150-250	Mínimo 5	Mínimo 6
Carta al editor	500-1000	No requiere	Hasta 5	No requiere
Editorial	Máximo 1000	No requiere	Hasta 8	No requiere

* Los valores expresados en la tabla son orientativos. Cualquier variación se sugiere que sea consultada con el Comité Editorial.

**Lo indicado no contempla las secciones Títulos, Nombre de los Autores, Filiación, Resumen/Abstract y Referencias o Bibliografía.

COMITÉ EDITORIAL



Ministerio de Salud
Argentina

www.argentina.gob.ar/anmat