ISBN 978-987-46701-4-4

Sección IV.
Monitoreo de aguas y ambientes.
Validaciones microbiológicas de procesos.

Página

Capítulo IV1. **Control microbiológico de Aguas** **294**
Sergio Iglesias y Mónica Lagomarsino

Capítulo IV.2. **Monitoreo ambiental** **306**
Claudio Denoya

Capítulo IV.3. **USP <1116> y las Implicancias de las Tasas de Recuperación de Contaminación Microbiana** **333**
Claudio Denoya

Capítulo IV.4. **Media fill** **340**
Néstor O. Aversa

Capítulo IV.5. **Validación de limpieza de equipos productivos** **350**
Christian Uriarte

Capítulo IV.1.

Control Microbiológico de Aguas

Mónica Lagomarsino y Sergio Iglesias

Introducción

Tipos de agua

Muestreo

Métodos de recuento

Métodos para la investigación de microorganismos indicadores

Establecimiento de límites y evaluación de resultados

Resultados fuera de límites

Bibliografía

Introducción

El agua es la sustancia más utilizada en la industria farmacéutica, ya sea como ingrediente de productos, o durante alguna etapa de la elaboración, o para el lavado del equipamiento. Es importante el monitoreo microbiológico del agua potable al ingreso en planta de tratamiento, y luego en las etapas de purificación, almacenamiento y distribución del agua, ya que los microorganismos pueden proliferar en dicho sistema, afectando su calidad y por lo tanto la del producto elaborado.

Los métodos de control de productos no estériles descriptos en las farmacopeas no son aptos para ser utilizados para el análisis de aguas, ya que para este caso se han elaborados algunos medios de cultivo màs adecuados para el desarrollo de los microorganismos que están habituados a vivir en un medio sin materia orgánica ni sales, y en ocasiones injuriados por el hipoclorito de sodio u otros agentes, o por el tratamiento con luz ultravioleta, cuando se los utiliza para mantener niveles bajos de carga microbiana.

El objetivo de este capítulo es hacer una reseña de los métodos que pueden utilizarse en el control microbiológico de las aguas. Dado que por lo general no hay normas respecto al procedimiento que se debe usar, y es responsabilidad del microbiólogo justificar y documentar la elección del método.

La justificación del método no puede realizarse a través de un ensayo de recuperación de microorganismos agregados, tal como se realiza la aptitud de los métodos aplicados a los productos. Habitualmente la “validación” se realiza eligiendo el mejor método por comparación entre los resultados de ensayos efectuados en paralelo utilizando muestras reales de aguas, con la microflora propia del lugar donde se encuentra ubicado el sistema de purificación de agua que se quiere controlar.

Una vez obtenido el resultado de un análisis microbiológico de aguas, en este capítulo se dan pautas para ayudar en la investigación de la desviación de dicho resultado.

Tipos de Aguas

A continuación se detalla la clasificación de aguas, de acuerdo al uso que se intenta dar y a su método de obtención:

Agua Potable:

No se utiliza para elaborar productos farmacéuticos, pero en general los sistemas de purificación parten de este tipo de agua, y por lo tanto debe ser controlada. Se utiliza además para la primera etapa del lavado de equipos productivos incluyendo el primer enjuague, y para el lavado de las instalaciones de los sectores de elaboración. También se utiliza en las primeras etapas de la elaboración de ingredientes activos (APIs).
Los límites microbianos en general podrían variar según el país. En Argentina el Código Alimentario (art. 982) [1] especifica un Recuento de bacterias mesófilas de no más de 500 UFC/ ml en agar (APC - 4 hs a 37 °C); un Recuento de Coliformes totales de no más de 3 NMP (número más probable) en 100 ml, y ausencia de *Escherichia coli* y de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml.

Agua Purificada:

El Agua Purificada se obtiene a partir del Agua Potable a través de un proceso de purificación, que comprende al menos prefiltración, declorinación, ablandado y deionización por uno o más de los procesos siguientes: intercambio iónico, ósmosis inversa, electrodeionización, destilación.
Respecto de los límites microbianos, el agua purificada debe cumplir con un recuento de no más de 100 UFC/ ml, aunque algunos productos pueden requerir un agua de una calidad superior. Por ejemplo, cuando un agua se utiliza para elaborar un producto acuoso cuyo límite de recuento microbiano es 100 UFC/ ml, el agua que forma parte de ese producto no puede ser elaborada con un agua en la que se espera tener un recuento equivalente al producto terminado, por lo que es necesario tener un sistema que asegure una calidad superior de agua de por ejemplo menos de 100 UFC en 10 o 100 ml de agua.
Las farmacopeas no indican ausencia de microorganismos específicos, sin embargo, cuando el agua se va a utilizar para la elaboración de productos en los cuales debe haber ausencia de *Pseudomonas aeruginosa,* es conveniente asegurar durante el monitoreo del agua su ausencia, por ejemplo, en 100 ml. Además es conveniente controlar la presencia de *Pseudomonas* porque habitualmente forman *biofilms* en los sistemas de producción y distribución de aguas.

Agua para Inyectables:

El agua para inyectables se obtiene por destilación a partir de agua purificada, aunque en algunos países podría considerarse aceptable el agua obtenida por ósmosis inversa o por ultrafiltración.
Desde el punto de vista microbiano debe cumplir con un límite de no más de 10 UFC en 100 ml de agua, y con no más de 0.25 EU/ ml de Endotoxinas bacterianas. Para cumplir consistentemente con un recuento tan bajo, el Agua Destilada debería almacenarse en tanques con alta temperatura, por lo general mayor a 80 °C.

Muestras

Los recipientes para el muestreo pueden ser envases de vidrio borosilicato o plástico, o bien bolsas descartables estériles. En los casos en que el agua ha sido clorada, es necesario agregar un agente reductor en el momento del muestreo (no en el momento del análisis). Se utiliza para ello solución de Tiosulfato de Sodio la cual puede agregarse al envase antes de esterilizar teniendo en cuenta que 0.1 ml de una dilución al 3% en una muestra de 120 ml neutralizará más de 5 mg/l de cloro residual [2]. Existen en el mercado bolsas descartables estériles que contienen para este fin comprimidos de Tiosulfato de Sodio en su interior.

Las muestras de agua deben ser analizadas lo más pronto posible para evitar cambios en el recuento microbiano. En caso de no ser posible su análisis dentro de la hora posterior a su colección, la muestra debe transportarse y conservarse entre 2 y 10 ºC. No exceder las 8 hs hasta efectuar el recuento, y no exceder las 30 hs hasta el análisis de bacterias coliformes [2]. Los registros de muestreo, recepción y análisis deben poder demostrar que se cumplen los tiempos establecidos en el procedimiento.

Si bien la sanitización externa de la válvula y posterior *flushing* o descarte de agua, podría eliminar el riesgo de que microorganismos que están en el último tramo de la cañería puedan ir a la muestra ocasionando recuentos altos, estos procedimientos se utilizan sólo cuando los puntos son de muestreo y no puntos de uso. En caso de tratarse de puntos de uso para elaboración de productos farmacéuticos, el muestreo debe reflejar exactamente el modo de extracción del agua que se usa en producción. Esto se realiza para asegurar que los recuentos obtenidos en los puntos de uso representan los recuentos reales del agua que se utiliza directamente en el producto que se va a elaborar.

Si el agua se recoge para su uso a través de una manguera, la muestra también debe tomarse de la misma manera. Las mangueras, cuando no se utilizan, deben retirarse y dejarse colgando para que puedan escurrir e impedir que quede agua estancada en su interior. A pesar de ello, con una frecuencia que se debe establecer, las mangueras se limpian o mejor aún, se esterilizan por autoclave.

Método de recuento

El recuento microbiológico puede efectuarse por el método de volcado en placa – *pour plate* - o por el de filtración, este último sólo se indica cuando el volumen de agua a analizar es grande (> 2 o 5 ml) y el recuento es bajo. Por ejemplo, para el recuento de Agua para Inyectables, o para el recuento de Agua Purificada utilizada en la elaboración de líquidos.

Los medios de cultivo que se utilizan para el recuento pueden ser de altos o de bajos nutrientes. Entre los medios de altos nutrientes, el Plate Count Agar (PCA) es el más ampliamente utilizado y es el recomendado por la USP [(3)]. Sin embargo, recuentos más altos se obtienen cuando se utilizan medios de bajos nutrientes como el R2A que es el indicado por la Eur. Ph.[(4)], y es opcional para la USP; aunque debe tenerse en cuenta que este medio requiere mayor tiempo de incubación.

Los autores del presente capítulo han efectuado ensayos en paralelo con ambos medios de cultivo, y han observado, sobre todo cuando se utiliza el método por filtración, que las colonias obtenidas con el medio R2A son más pequeñas, translúcidas e incoloras que las obtenidas con PCA, dificultando el recuento, el cual por lo general y para ser confiable, debería realizarse con un microscopio estereoscópico o lupa estereoscópica con luz incidente superior en un ángulo de 45º. De esta manera sobre la membrana se pueden observar las colonias por la luz en su convexidad y por la sombra que provoca esa luz.

La USP [(3)] para el monitoreo de Agua Purificada recomienda el control de como mínimo 1 ml de agua muestra por el método de volcado en placa, y utilizando medio PCA y condiciones de incubación durante como mínimo 48 a 72 hs a 30-35 ºC.

La Eur. Ph.[(4)] en la monografía *Water Purified* indica que el volumen de la muestra debe ser elegido de acuerdo al resultado que se espera obtener, utilizando el método de filtración con medio R2A a 30-35 ºC durante no menos de 5 días.

La USP, en el capítulo <1231> también sugiere la incubación a 20-25 ºC cuando se utilizan medios con bajos nutrientes, con un período de incubación de 5 a 7 días, aunque para recuperar microorganismos de crecimiento lento o injuriados. Según esa farmacopea puede requerirse un tiempo de incubación más largo que podría llegar hasta los 14 días. Por ejemplo, la bacteria *Methylobacterium mesophilicum* es un contaminante habitual de sistemas de agua –desarrolla como colonias de color rosa- de crecimiento muy lento (> 5 días a 30-35 ºC), y si se aplican los tiempos de incubación recomendados por la USP, su presencia no podrá ser detectada.

Según el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [(2)], los recuentos más altos se obtienen cuando se incuba entre 5 y 7 días a 20-28 ºC, manteniendo la humedad para que las placas no pierdan más que el 15% de agua.

Para el monitoreo de Agua para Inyectables (WFI), el volumen mínimo de análisis es 100 ml que se filtran a través de membrana [(2,4,5)], pero USP y JP (Farmacopea Japonesa) recomiendan filtrar un volumen mínimo de 200 ml [(3)].

Los medios de cultivo utilizados para el recuento por el método de volcado en placa deben estar fundidos y mantenidos a 44-46 ºC. Lo ideal es comprobar previamente la temperatura de los medios de cultivo. Para lograrlo sin afectar la esterilidad del medio, ese control puede efectuarse por medio de un termómetro infrarrojo, el cual mide la temperatura a distancia y sin ser introducido dentro del recipiente, o validando los tiempos de estabilización de los medios en estufas con temperatura controlada o en los baños termostáticos.

Los recuentos por el método de volcado en placa deben efectuarse por duplicado, promediando el recuento obtenido en cada placa; y debe efectuarse una placa de control negativo del medio de cultivo. Esta placa será importante cuando ante un resultado alto de recuento descarta o no un posible error de análisis ocurrido en el laboratorio, por ejemplo, cuando el medio de cultivo está contaminado. Ver el capítulo de Desviaciones de los Resulados Microbiológicos en este Manual.

Cuando se utiliza el método de volcado en placa, el recuento más preciso es aquel en el que en cada placa se pueden contar entre 30 y 300 colonias - aunque la USP en el capítulo <1227> señala al rango de 25 - 250 colonias como el más preciso -. La necesidad de fijar un rango de lectura se debe a que un recuento menor al rango va acompañado de un error estadístico; y cuando el recuento es mayor al rango, las colonias que se forman compiten por los nutrientes del medio y pueden adquirir tamaño menor o no desarrollar. Sin embargo, por lo general, y cuando el sistema de aguas está bajo control, los recuentos son nulos o casi nulos, aún con mayores volúmenes de muestra

En el caso en que el recuento sea nulo, éste no se debe informar como cero, sino como <1 UFC/ ml o en el volumen que ha sido analizado (por ejemplo <1 /10 ml o <1 /100ml) o, en el caso de haberse analizado una dilución de la muestra, multiplicando el promedio del recuento obtenido en cada placa por el correspondiente factor de dilución, en ese caso si el recuento resulta nulo se debe informar como "Menos UFC que el factor de dilución /ml", por ejemplo, para una siembra por volcado en placa de 1 ml de una dilución 1:10, cuando no hay colonias se informa como "<10 UFC /ml".

Si el número de colonias supera las 300 UFC, y no se previó una dilución de la muestra, es habitual informar el resultado como TNTC (*too numerous to count*) o como "incontables". Sin embargo, en estos casos un método más adecuado es el descripto por *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* [(2)] y que se resume a continuación, teniendo en cuenta que cada cuadrado de un cuentacolonias tiene una superficie de 1 cm^2.:

- En el caso de realizar el análisis por volcado en placa, si hay más de 10 colonias, pero menos de 100 en 1 cm^2, contar 13 cuadros independientes de 1 cm^2 en un contador de colonias, sumar los recuentos y multiplicar por 5 (en placas de 9 cm de diámetro). Cuando hay más de 10 colonias en 1 cm^2, contar 4 cuadros representativos, promediar y multiplicar por 57 (para placas de 9 cm de diámetro). En todos estos casos el valor obtenido se debe expresar como *estimado (e)*. Cuando hay más de 100 colonias por cm^2, informar como >5700 UFC en el volumen de agua sembrada", o multiplicar por el factor de dilución empleado.
- Si se emplea el método por filtración, donde el rango de lectura recomendado por membrana es de 20-200 UFC, si el número de colonias en una membrana cuadriculada es menor o igual a 2 por cuadro, contar todas las colonias. Si hay entre 3 y 10 colonias por cuadro contar 10 cuadros, promediar y multiplicar por 100. Para 10 a 20 colonias por cuadro contar 5 cuadros, promediar y multiplicar por 100. Nuevamente en todos estos casos el valor obtenido se debe expresar como *estimado (e)* Si hay más de 20 colonias por cuadro informar como >2000 UFC en el volumen filtrado.

Otro método puede emplearse, y cualquiera que sea el utilizado, debe estar descripto en un procedimiento.

Aptitud del método de recuento de aguas: Como se expresó en la introducción de este capítulo, existe una dificultad para efectuar la prueba de aptitud de los métodos de recuentos, lo cual es fácil de aplicar para otros controles microbiológicos, pero no para el agua, lo cual trataremos de explicar:

Los microorganismos que habitualmente son contaminantes del Agua Purificada son *Pseudomonas, Burkholderia* y otras, adaptadas por lo general a crecer en un ambiente con muy bajos nutrientes. Si se comparan los recuentos obtenidos con cepas de colección no adaptadas a bajos nutrientes como la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en medios TSA, PCA y R2A, el mayor recuento se obtiene en TSA (los autores de este capítulo lo han comprobado en el laboratorio), sin embargo, cuando el agua contiene cepas salvajes de *Pseudomonas*, provenientes de sistemas acuáticos, el mayor recuento se obtiene en R2A. Eso se explicaría por las características propias del R2A de ser un medio con bajos nutrientes que representaría mejor el ambiente de la microflora del agua. Por otro lado, se debe considerar el estado metabólico de las cepas salvajes, a veces injuriadas por el procedimiento de purificación, o previamente por la cloración del agua potable que ingresa al sistema de purificación. Por todo esto no se debe evaluar la aptitud del método de recuento con cepas de colección.

La manera de elegir el mejor método (mejor método significa "con el que se obtiene mayor recuento") es efectuando ensayos en paralelo con los distintos medios y condiciones de incubación a evaluar, y posteriormente analizando estadísticamente los resultados. El inconveniente de este procedimiento es que habitualmente los recuentos obtenidos son muy bajos en los puntos de muestreo del agua purificada, pero habitualmente se encuentran recuentos en las aguas de los puntos intermedios de los sistemas de purificación, que podrían ser útiles para este fin. Otra opción, y para evaluar métodos por filtración, es filtrando grandes volúmenes de agua para obtener un recuento que permita la comparación.

Efectuar ensayos con distintos métodos es habitual y conveniente mientras un sistema de aguas está en etapa de validación. De esa manera se pueden establecer los métodos (medio de cultivo, volumen de muestra, tiempos y temperaturas de incubación) que permitan la mayor recuperación. Por ejemplo, durante dicha etapa se pueden analizar en algún punto en paralelo 1 ml por volcado en placa y 100 ml por filtración, para evaluar cuánto margen de seguridad hay en el recuento frente al límite: un recuento en 100 ml permitiría actuar más tempranamente frente a un alerta y por ejemplo se puede detectar antes la presencia de un *biofilm*.

Métodos para la investigación de microorganismos indicadores

Pseudomonas aeruginosa:

Cuando se especifica ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aguas, se refiere por lo general a la ausencia en no menos de 100 ml.

Este requerimiento es para aguas potables. Y a pesar de no estar indicado en aguas purificadas en las farmacopeas internacionales, su monitoreo podría ser realizado cuando los productos a elaborar no deben tener presencia de este microorganismo, o cuando es conveniente para alertar sobre la posible formación de *biofilms*. No se requiere la investigación de Pseudomonas en Agua para Inyectables, ya que es deseable en ese tipo de aguas la ausencia de Gram negativos en general.

El método que generalmente se emplea es el recuento por el método de filtración de 100 ml de agua a través de una membrana de 0,45 µm y la posterior incubación de la membrana sobre una placa que contiene Agar Cetrimida previamente solidificado. Este medio de cultivo tiene la desventaja de ser inhibidor, y más aún si los microorganismos están injuriados, o por contacto con el hipoclorito agregado a las aguas potables para mantener su condición de potabilidad desde el punto de vista microbiano, o por la luz UV que generalmente está presente en los sistemas de purificación de aguas, o por la temperatura de almacenamiento, o debido a la ozonización. Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en Agar Cetrimida son de color verdoso con pigmento que por lo general difunde en el agar por debajo de la membrana. Por este método las colonias pueden ser cuantificadas. Deben además ser identificadas ya que hay otras pseudomonas o similares que pueden confundirse, como *P. fluorescens, B. cepacia, P. aeurofasciens* o *P. putida*.

Es importante subrayar que, como por lo general las especificaciones indican que *Pseudomonas aeruginosa* deben estar *ausentes*, la cuantificación no es necesaria. Además, como las Pseudomonas producen *biofilms*, según la etapa de formación del mismo (Ver capítulo de *Biopelículas* en este manual), puede o no haber recuento nulo o muy alto en el agua, que tienden a confundir. Por lo tanto con sólo determinar presencia o ausencia es suficiente.

Los autores hemos probado que el siguiente método es apto para el ensayo, aumentando las probabilidades de detectar la presencia de estas bacterias: El método consiste en la filtración de 100 ml del agua a analizar, y la posterior inmersión de la membrana en no menos de 50 ml de Caldo Tripticasa Soya. Luego de un mínimo de 3 días de incubación a 30-35 ºC, y sólo en caso de existir turbidez en el medio, se efectúa el pasaje a Agar Cetrimida. Ese enriquecimiento previo en el caldo permite la recuperación de las bacterias injuriadas, y por lo tanto aumenta la detectabilidad posterior en Agar Cetrimida, respecto del método de recuento antes citado.

Ensayos para coliformes totales y fecales

El término *Coliformes* se utiliza para aquellas bacterias Gram negativas, que son capaces de fermentar lactosa como única fuente de carbono y con producción de gas dentro de las 48 hs cuando se incuban a 35-37 ºC. La presencia de coliformes indicaría contaminación fecal lejana en el espacio o en el tiempo. En esta categoría entran algunos géneros de la Flia. Enterobacteriaceae, algunas de las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza y que no necesariamente son patógenas.

Escherichia coli es una bacteria perteneciente a esta familia que puede tener origen fecal, por lo que su presencia se considera indicador de contaminación fecal. Este organismo es bilis tolerante y puede desarrollar a 44 ºC.

Habitualmente el recuento de coliformes se determina empleando el método de Número más Probable (NMP), aunque también existen métodos por filtración a través de membrana (MF). Pero también puede ser suficiente el uso de métodos de Presencia / Ausencia (P/A), aunque la autoridad sanitaria argentina requiere cuantificar este método para Coliformes totales.

(a) Método de Presencia-Ausencia: Es el método más simple. Se puede utilizar el Caldo P-A en simple, doble o triple concentración según la cantidad de muestra a agregar, descripto en la sección 9221.D de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* [2].

Si embargo, una alternativa rápida y fácil es el uso de métodos Enzima-Sustrato, en el que se utiliza para la determinación de coliformes totales un sustrato cromogénico como o-*nitrofenil-β-D-galactopiranósido* (ONPG) o Rojo de *clorofenol-β-D-galactopiranósido* (CPRG ó X-GAL), que detectan la presencia de la enzima β-D-galactosidasa, producida por los coliformes totales. Adicionalmente estos medios comerciales contienen un sustrato fluorogénico como MUG (*4-methylumbelliferyl-beta-D- glucuronide*), que detecta la presencia de la enzima β-glucuronidasa, producida solamente por *E. coli*, y que se detecta bajo luz UV. Estos medios comerciales se adquieren en sobres o ampollas del medio en polvo fraccionado listo para usar, y que se agrega directamente en forma aséptica a los 100 ml del agua a controlar, con posterior incubación durante 24-48 hs a 30-35 ºC.

Este método puede hacerse cuantificable, según se explica en el punto (c).

(b) Método NMP: La precisión de este método depende del número de tubos empleados, y el recuento se obtiene mediante el uso de tablas que se establecieron considerando una distribución de Poisson. Como método presuntivo para la detección de coliformes totales puede emplearse Caldo Lauril Triptosa, distribuido en tubos en los cuales se colocan campanitas de Durham o pequeños tubos invertidos para detectar producción de gas a partir de la lactosa contenida en el medio de cultivo. El medio puede contener Púrpura de Bromocresol (0.001 g/ l) como indicador para detectar la producción de ácido. Como método confirmatorio, los medios de los tubos positivos se repican en otros tubos conteniendo Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante, también con tubos de fermentación invertidos, e incubándolos durante 18 hs a 35 ºC. Para la determinación del NMP de coliformes fecales, puede utilizarse el Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante conteniendo MUG (*4-methylumbelliferyl-beta-D- glucuronide*) para detección de *E. coli* incubando a 44.5 ± 0,2 ºC. Según el número de tubos empleados, se recurre a tablas de NMP para obtener el resultado de recuento de Coliformes totales.

(c) Método NMP empleando P-A: Alternativamente, y como ensayo semi cuantitativo simplificado, el mismo medio comercial utilizado para el Método de Presencia – Ausencia puede utilizarse para efectuar una cuantificación, fraccionando los 100 ml en 5 tubos de 20 ml cada uno (algunos de esos medos comerciales proveen celdas para realizar este fraccionamiento). En ese caso el NMP con el 95% de confianza para todas las combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan porciones de 20 ml de agua, todos los posibles resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: *NMP con el 95% de confianza para todas las posibles combinaciones de recipientes positivos y negativos con porciones de 20 ml de muestra* [2].

Nº de tubos Positivos (20 ml/ tubo)	NMP/ 100 ml	Límites (95% Confianza)	
		Menor	Mayor
0	<1,1	-	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,40	8,4
3	4,6	1,0	13
4	8,0	2,1	23
5	>8,0	3,4	-

El uso de este método puede ser suficiente para estimar la densidad de coliformes totales en la mayoría de las muestras de aguas, sin embargo, en caso de ser necesaria mayor precisión, o si se sospecha de un alto recuento de coliformes, otros métodos de NMP pueden ser utilizados [4].

(d) Método de filtración por membrana (MF): Este método puede ser más reproducible y puede ser utilizado para muestras de mayor volumen. El método tiene limitaciones, sobre todo si el agua posee turbidez o cuando hay un alto recuento de bacterias no coliformes. Los medios de cultivo más utilizados para el recuento de coliformes totales son LES Endo Agar, en el que la membrana luego de la filtración

se apoya sobre el medio de cultivo solidificado, o Caldo M-Endo, el cual impregna un *pad* estéril sobre el cual se apoya la membrana luego de la filtración. Una vez finalizada la incubación, al menos el 10% de las colonias desarrolladas sospechosas de coliformes, deben ser identificadas. El recuento se expresa directamente como UFC en el volumen de agua que fue filtrada.

Existen en el mercado otros medios de cultivo, algunos con MUG, pero se recomienda siempre utilizar el NMP como método comparativo antes de decidir utilizar cualquier método por filtración.

Identificación: Los métodos anteriores son sólo presuntivos, por lo que es necesario identificar los microorganismos sospechosos para establecer el género y en lo posible la especie. Pueden utilizarse métodos fenotípicos.

Burkholderia cepacia:

No existe ninguna norma que establezca la investigación de ausencia de *B. cepacia*, aunque la mayoría de los productos retirados del mercado en USA son por esta causa. En el presente manual hay un capítulo dedicado a ese tema. Como rutina se debe saber que cuando los microorganismos que desarrollan en Agar Cetrimida son identificados por medio de sistemas fenotípicos como API 20 NE, *B. cepacia* puede ser detectado. Por eso es tan importante identificar todos los diferentes tipos de colonias que un microbiólogo entrenado reconozca como posibles colonias típicas.

Establecimiento de límites y evaluación de resultados

Los niveles de acción por lo general son los establecidos por farmacopeas o por entidades según la calidad del agua y el uso que se le va a dar.

- *Nivel de Acción* se define como un valor numérico que, una vez excedido, indica que el proceso está operando fuera de los parámetros normales.
- *Nivel de Alerta* se define como un valor numérico que cuando es excedido indica que el proceso podría operar fuera de los parámetros normales.

Puede ser que el Nivel de Acción no coincida con el nivel establecido en las farmacopeas, y esto sobre todo es cierto cuando se establece un nivel más exigente, de acuerdo al producto que se va a elaborar.

Los Niveles de Alerta pueden ser variables, pero un cambio hacia un nivel menos exigente debe ser justificado.

Los Niveles de Alerta deben ser establecidos por el laboratorio de acuerdo a los resultados obtenidos en cada punto de muestreo de un sistema de aguas. Por lo general los resultados de los recuentos de las aguas en los puntos de uso de un sistema bajo control son nulos o muy bajos, por lo que debería utilizarse una distribución de Poisson para establecer los Límites de Alerta. Sin embargo, ante la dificultad del cálculo, se han buscado otras alternativas, entre ellas el cálculo de percentilos con el 95% de confianza de que los resultados obtenidos estén dentro de dicho límite de alerta.

Las ventajas del cálculo de percentilos son la simplicidad y que no es necesario el cálculo de logaritmos de los resultados, que es indispensable en el uso de otras herramientas estadísticas, y que no permite estos cálculos cuando los recuentos son nulos, ya que no puede calcularse el logaritmo de cero.

Los niveles de alerta y de acción deben ser periódicamente evaluados (por ejemplo anualmente para incluir todas las estaciones del año y los períodos de vacaciones en los que el personal cambia). Para ello se estudian todos los recuentos obtenidos durante el período de evaluación.

Como ya dijimos, un método adecuado y aceptado es a través del cálculo de Percentilos: La determinación del percentilo 99% (0.99) para evaluar si el sistema cumple con que estadísticamente el 99% de los resultados están por debajo del límite de acción (el percentilo hallado debe ser no mayor a dicho límite), y la determinación del percentilo 95% (0.95) para determinar que estadísticamente el 95% de los resultados cumplen con el límite de alerta (el percentilo hallado debe ser no mayor a dicho límite).

Durante la evaluación conviene ver si existen tendencias y cómo influyeron los cambios que pudieron ocurrir durante el período de evaluación.

Métodos alternativos.

Además de los procedimientos que se describen en este capítulo, se pueden aplicar al análisis del agua otros, por ejemplo los llamados métodos rápidos microbiológicos (RMMs) o métodos alternativos, como Bioluminiscencia, Citometría de flujo y en fase sólida, Epifluorescencia y PCR entre otros. Estos métodos se detallan en el capítulo *Métodos rápidos para el análisis microbiológico de productos farmacéuticos* del presente manual.

Cuando se utilizan estos métodos, tener en cuenta que es necesaria la identificación de algunas de los microorganismos presentes, por lo que es importante evaluar métodos no destructivos.

Monitoreo del sistema de producción y distribución de aguas de uso farmacéutico

El agua no sólo es la materia prima más utilizada en muchos de los productos farmacéuticos y cosméticos, sino que además se utiliza para el lavado de los equipos de producción. Por lo general no se produce y fracciona en lotes, sino que la producción es continua, como también es continua la distribución, generalmente realizada a través de un loop o anillo. Es posible el monitoreo de conductividad y de TOC en línea, pero no es posible el monitoreo en línea de la calidad microbiológica del agua. Además debe tenerse en cuenta que el resultado del control microbiológico utilizando métodos tradicionales de cultivo se obtiene cuando el agua ya ha sido utilizada.

Es importante resaltar que el agua es una fuente de multiplicación de una gran variedad de microorganismos y también los sistemas de producción y distribución de aguas, o por falta de mantenimiento o por falla de diseño adecuado, pueden dar lugar a la formación de *biofilms* (ver capítulo de Biopelículas en este manual) muy difíciles de erradicar una vez instalados. Estas características hacen que la validación del sistema de aguas y el monitoreo a tiempos adecuados adquiera mayor importancia para asegurar que el sistema está bajo control.

El propósito del monitoreo del sistema de agua es:

- Controlar el equipamiento y el proceso de la generación, almacenamiento y distribución, para que consistentemente se cumplan los requerimientos microbiológicos, de endotoxinas bacterianas y la pureza química del agua.
- Verificar que los controles de los parámetros críticos son adecuados para asegurar que pequeños cambios no afectan al sistema.
- Proveer la garantía de la efectividad de los procesos de mantenimiento, limpieza y sanitización.
- Identificar tendencias y una alerta temprano de desviación del estado de control y de aumento de la contaminación [(6)].

Salvo para el monitoreo del agua para inyectables (WFI), el cual debe ser diario, no existe una normativa que establezca la frecuencia del monitoreo microbiológico de aguas de uso farmacéutico. La frecuencia debe ser suficiente para asegurar que la calidad del agua cumpla con los criterios de aceptación según el tipo de agua y el uso que se le va a dar.

Investigación de resultados

Cuando los resultados del recuento de las aguas superan los niveles de acción preestablecidos, o cuando se ha detectado presencia de microorganismos objetables o indicadores, o cuando se excede repetidamente el límite de alerta, una investigación debe ser realizada para determinar la causa del resultado obtenido. Habitualmente a esos resultados se los denomina OOT (*Out-of-trend*) u OOL (*Out-of-limit*) o MDD (*Microbiological Data Deviation*), y la investigación se efectúa de acuerdo a un procedimiento que ya debe estar preestablecido en un SOP (Standard Operation Procedure) o POE (Procedimiento Operativo Estándar). Ver el capítulo correspondiente a *Desviación de los resultados microbiológicos* en el presente manual.

La interpretación e investigación de los resultados del análisis microbiológico de aguas puede ser dificultosa debido a:

- La formación de *biofilms*, que puede desprenderse parcialmente en forma discontinua, obteniéndose recuentos erráticos, que no siguen una tendencia (excursiones).
- Por lo general el sistema de aguas opera en forma continua, y no hay un lote definido.

- Es posible que en el sistema en diferentes momentos durante el día haya cambios de temperatura, concentración de ozono -si lo hubiera-, cantidad de agua utilizada o caudal de agua que se repone, u otra variable que pueda afectar a la calidad microbiológica del agua en algún punto de muestreo.
- Las muestras de agua no pueden conservarse hasta obtener el resultado – utilizando los métodos tradicionales con medios de cultivo-, por lo que no es posible el reanálisis de una muestra similar a la original.

Por los motivos antes citados, cuando se realiza una investigación de un resultado de aguas, y no es posible volver a obtenerlo, es deseable que la investigación implique el muestreo en otros puntos y en varios momentos del día. Esto último es particularmente importante cuando el agua se utiliza en Producción en turno noche y los fines de semana.

Como no se espera el resultado del monitoreo del agua para ser utilizada, la investigación debería también incluir el control de los productos que se elaboraron o de los equipos que se lavaron con el agua, y su muestreo si corresponde.

La investigación también debe incluir la identificación de los microorganismos, inclusive de los obtenidos en los recuentos, y de controles de los materiales o productos que pudieron haber sido afectados.

Hay muchas causas que pueden provocar desviaciones de los resultados microbiológicos. A continuación listamos consideraciones a tener en cuenta durante una investigación:

- El agua potable usada como *feed water*, debe cumplir con los requerimientos mencionados antes. Pero aunque se cumplan, es muy recomendable clorar el agua, ya que el primer paso de la purificación es la prefiltración, que es el proceso por el cual se remueven partículas de más de 7 y 10 µ, pero a su vez las bacterias pueden adsorberse en la gran superficie de ese lecho, produciendo *biofilm*. El cloro libre ayuda a prevenir o controlar su formación.
- Si el sistema tiene lecho de Carbón activado, hay que tener en cuenta que altos niveles de cloro lo destruye, pero este lecho puede eliminar bajos niveles. La gran superficie del lecho en contacto con el agua también provoca formación de *biofilm*. En este caso, como no hay cloro residual o es eliminado, el lecho no tiene protección antimicrobiana, y los niveles alcanzados de recuentos suelen ser muy altos.
- Por lo general actualmente se reemplaza el Carbón activado por Metabisulfito de Sodio, que elimina el cloro residual del agua se acuerdo a las siguientes reacciones químicas:

$$Na_2S_2O_5 + 2Cl_2 + 3H_2O \rightarrow 2NaHSO_4 + 4HCl$$

$$3Na_2S_2O_5 + 2NH_3 + 6Cl_2 + 9H_2O \rightarrow 6NaHSO_4 + 10HCl + 2NH_4Cl$$

- El ablandado es realizado por resinas de intercambio iónico, en las cuales los iones Na^+ se intercambian por iones bivalentes del agua. Estas resinas producen también *biofilm* y, por lo tanto, riesgo de contaminación del agua resultante.
- Las resinas de intercambio iónico para deionizar el agua también producen *biofilms*, aunque la regeneración de estas resinas se realiza con ácidos y álcalis fuertes con fuerte acción antimicrobiana que los destruyen.
- Por lo general los sistemas cuentan con filtros no bacteriológicos que retienen partículas. Estos filtros dejan pasar bacterias, pero también los filtros son colonizados y las bacterias se multiplican en su superficie, y luego aumentan la contaminación del agua resultante. Estos filtros requieren un recambio a tiempos establecidos.
- La membrana de ósmosis inversa es una barrera que puede permitir el paso de la contaminación y de iones cuando hay rotura de la misma, o cuando hay saturación. Actualmente existen membranas que pueden sanitizarse por tratamiento por calor. Las membranas son sensibles al hipoclorito y debe asegurarse que es eliminado antes de llegar a ella. Por lo general se coloca un punto de muestreo posterior a la ósmosis inversa.
- Luego de la ósmosis inversa puede utilizarse la Electrodeionización, y/o luz ultravioleta.
- Sean estas últimas o la Ósmosis inversa el último paso en el proceso de purificación, el agua resultante debe cumplir con los niveles de acción y alerta preestablecidos. También luego en todo el sistema de distribución y sus puntos de uso. En el resto de los puntos de muestreo, durante las etapas de purificación el recuento alcanzado debe ser sólo informativo, y tendrá como objetivo prevenir la formación de *biofilms* y decidir tareas

de mantenimiento del sistema. No existen límites o niveles preestablecidos para estos puntos de muestreo intermedios.

- Si se utiliza filtro bacteriológico antes de utilizar el agua, no debe ser colocado con el fin de enmascarar una contaminación del sistema.
- El agua debe estar recirculando con flujo turbulento, continuamente o a intervalos que aseguren que se impide la formación del *biofilm*.
- La manera más conveniente para la conservación del Agua Purificada es en tanque de almacenamiento a temperatura de no menos 80 °C. Y éste es el método indicado para la conservación del Agua para Inyectables, ya que la temperatura alta no permite la multiplicación microbiana. Pero para que ese método sea efectivo, el agua debe recircular en las cañerías pasando por los puntos de uso, en forma continua o a intervalos validados de tiempo. Generalmente para ser utilizada, el agua debe estar a temperatura ambiente; y en estos casos se recurre a enfriadores; pero hay que monitorear el sistema luego del enfriamiento para prevenir la instalación de *biofilms*, además se debería establecer una frecuencia de sanitización de estas cañerías con agua caliente, incluyendo la apertura de todas las válvulas que están en ese recorrido.
- Cuando no puede utilizarse un sistema caliente de conservación y distribución, usualmente se usa Ozono. La Ozonización permite una decontaminación rápida, y evita formación de *biofilms*. No es considerada sustancia agregada por no dejar ningún residuo, pero no debe estar presente cuando el agua se incorpora a un producto, por su fuerte poder oxidante. Por esa razón debe eliminarse antes, y para ello se recomienda el uso de luz ultravioleta a la salida del agua.
- Es conveniente efectuar el muestreo de al menos 2 puntos del *loop* por día, ya que la comparación de los resultados permite sospechar si la contaminación existe en todo el *loop*, o en un sector en particular.
- Muchas válvulas no permiten un perfecto drenaje del agua una vez tomada la muestra o utilizada el agua para la elaboración. En esos casos, si no pueden reemplazarse por oras válvulas, deben tomarse medidas para evitar que el agua quede retenida y estancada permitiendo la proliferación microbiana. Una medida puede ser el retiro del agua acumulada con jeringas estériles u otra forma de absorción que no deje partículas. Otra forma puede ser reemplazar el agua acumulada luego del muestreo con Etanol 70%, siempre que la muestra de TOC no se tome a continuación.
- Si se utilizan mangueras para la toma de agua, y se sospecha de contaminación microbiana dentro de la misma, además de tomar una acción como la esterilización o desinfección de la manguera, se puede demostrar si la causa de la contaminación es la manguera, tomando la muestra de agua con y sin manguera y comparando los resultados.
- Hay muchas otras causas de contaminación de aguas que pueden estudiarse, y para ello muchas veces es necesario que personal de Ingeniería, Producción y/o Garantía de Calidad investiguen en conjunto.

Cuando el agua da resultados fuera de los niveles de aceptación, no necesariamente el producto debe ser rechazado. En ese caso deberá probarse que el lote no fue afectado por el estado del agua utilizada, a través del método de rutina utilizado para el análisis del producto, o por la utilización de otro método adecuado y validado, si es necesario. Podría ser necesario desarrollar otro método para detectar o efectuar recuento de microorganismos presentes en el agua utilizada en el producto, pero que el método habitual para su análisis no es adecuado para ese fin.

Garantía Calidad en el laboratorio

Los resultados obtenidos en el análisis del agua deben ser confiables, para lo cual el laboratorio debe contar con instalaciones apropiadas, personal con un nivel adecuado de entrenamiento tanto en el muestreo como en el análisis incluyendo la identificación microbiana y el recuento, y un microbiólogo experimentado a cargo.

En el laboratorio deben efectuarse controles de calidad de todos los lotes de los medios de cultivo empleados y de los sistemas o kits de identificación microbiana, calificaciones de las incubadoras y de las heladeras, validaciones de los ciclos de esterilización, control periódico de los filtros HEPA y calibración de todos los instrumentos de medición.

El laboratorio debe contar con procedimientos escritos adecuados para todas las tareas que se realizan, incluyendo los procedimientos de limpieza, desinfección y/o mantenimiento de áreas y equipos y de lavado de materiales reusables, y los procedimientos escritos para los análisis de las aguas.

Los medios de cultivo deben ser elaborados con Agua Purificada que cumpla con los requisitos físico-químicos de Agua Purificada y con un recuento total de no más de 10^3 UFC/ ml [(2)].

Cálculo de la precisión de los analistas [(2)]: Para poder promediar los resultados de las placas duplicadas de recuentos, la diferencia máxima que debe haber entre los recuentos leídos debe ser establecida.

Una manera de establecer esa diferencia es recolectar los resultados obtenidos, siempre que los recuentos no sean cero, de al menos 15 análisis de aguas, y registrarlos en una tabla según el ejemplo de la Tabla 2, como D1 y D2. Calcular luego el logaritmo de ambas lecturas, que se registran como L1 y L2. Calcular luego el rango R, que es la diferencia entre L1 y L2 sin el signo.

Otra manera es preparar muestras de agua inoculando una suspensión bacteriana (por ejemplo *P. aeruginosa* por ser típico de aguas), de modo de obtener menos de 100 UFC/ placa.

Tabla 2. *Ejemplo de tabla de cálculo.*

D1	D2	L1	L 2	R
36	40	1,5563	1,60206	0,046
27	40	1,43136	1,60206	0,171
26	27	1,41497	1,43136	0,016
35	38	1,54407	1,57978	0,036
,,,	,,,	,,,	,,,	,,,

Calcular luego el promedio de todos los rangos $\overline{R}$, y luego calcular el *Criterio de precisión* multiplicando dicho promedio por el valor 3.27. Efectuar ese cálculo para cada analista.

Promedio de los rangos: $\overline{R} = \frac{\sum R_i}{i}$

Criterio de precisión: $\overline{R}$ x 3.27

Este resultado deberá ser menor que un valor (criterio de aceptación) que se debe establecer en el laboratorio. Un valor adecuado puede ser *no más de 0.3*. Este valor surge de un criterio comúnmente aceptado en laboratorios en que la diferencia entre duplicados de un recuento microbiológico debe ser no más de 0.3 log. Un criterio de aceptación más estricto también puede ser empleado

Si un analista excede el criterio preestablecido, no debe realizar recuentos hasta que no esté debidamente entrenado para ello, y que cumpla con un nuevo ensayo de precisión.

Bibliografía

1. Código Alimentario Argentino. http://www.anmat.gob.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf
2. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition. APHA. AWWA. WEF.
3. United States Pharmacopeia. USP. <1231> *Water for Pharmaceutical Purposes*.
4. European Pharmacopea (Eur. Ph)
5. FDA. *Guide to inspections of High Purity Water Systems*. July 1993.
6. Dilip Ashtekar. *Monitoring of Microbiological Quality Attributes of Water for Pharmaceutical Use*. Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices. Business Horizons Pharmaceutical publishers. 1st edition 2011.

Capítulo IV.2.

Monitoreo ambiental

Claudio Denoya

Introducción

Importancia de un programa de monitoreo microbiológico para ambientes controlados

Objetivos de un programa de monitoreo microbiológico

Programa de monitoreo microbiológico dentro del programa general de monitoreo ambiental

Monitoreo de manufactura y áreas control microbiológico

Monitoreo de áreas no productivas, de soporte, o del laboratorio de ensayos de esterilidad.

Niveles de alerta y acción

Caracterización de los microorganismos aislados

Aisladores para realizar el ensayo de esterilidad o procesos asépticos

Tendencias

Entrenamiento del personal

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en el aire. Métodos tradicionales.

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en superficie. Métodos tradicionales.

Métodos No Tradicionales y Rápidos para el Monitoreo Ambiental Microbiológico

Conclusiones

Bibliografía

Introducción [1-7]

La manufactura de medicamentos y de dispositivos médicos utilizados en forma directa en pacientes requiere la aplicación de estrictas normas de control, definidas en numerosas publicaciones provenientes de entes nacionales e internacionales. Deben tenerse en cuenta varios factores, tales como un grupo de profesionales competentes y especializados, capaces de definir las áreas críticas de manufactura, y las medidas de control adecuadas para asegurar la producción de medicamentos satisfaciendo los más altos niveles de seguridad para el paciente, el establecimiento de un programa adecuado para la toma de muestras, la obtención de los datos de control y la interpretación correcta de los resultados, como así también la implementación de un sistema de seguimiento de datos a través del tiempo (estudio de tendencias).

El programa de monitoreo microbiológico ambiental, uno de los elementos críticos en el proceso de producción de productos medicinales, debe ser aplicado en forma rutinaria y periódica (diariamente, semanalmente, mensualmente, etc.), y los datos deben ser obtenidos por técnicos adecuadamente entrenados usando instrumentos controlados y medios de cultivos preparados y probados de acuerdo con las normas de control de calidad vigentes.

Finalmente, se deben establecer límites para cambios o aumentos significativos en el número de unidades formadoras de colonias encontradas en el ambiente (niveles de alerta y de acción).

Estos límites de acción y alerta deben establecerse después de acumular suficientes datos a lo largo de un período extenso de monitoreo (idealmente incluyendo cuatro cambios estacionales o un año completo).

Es muy importante contar con procedimientos escritos que detallen los pasos a tomar en caso que estos límites sean excedidos, como así también efectuar una investigación adecuada incluyendo la caracterización del microorganismo hallado (resultado del Gram, morfología de colonia e identificación), y contar con una lista de acciones correctivas y de prevención para eliminar el problema de contaminación.

Los métodos más comunes de monitoreo ambiental, y en particular los microbiológicos están resumidos en las Tablas 1 y 2. Las secciones siguientes en este capítulo están dedicadas a una discusión más detallada de los conceptos generales mencionados en esta introducción.

Tabla 1. *Programas de Monitoreo Ambiental*

Componente	Comentarios
Agua	Es el material básico más utilizado en la formulación, procesamiento y producción de productos farmacéuticos. El control microbiológico del agua es uno de los componentes esenciales del monitoreo ambiental.
Gases a presión	Aire, gas, nitrógeno a presión, y todos los elementos asociados (compresores, tubos, etc.) deben ser monitoreados periódicamente.
Aire	Este monitoreo incluye detección de partículas viables y no viables.
Superficies	Este monitoreo requiere el uso de medios de cultivo y toma de muestra apropiados para los diferentes tipos de superficies.
Operarios	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y manos por impresión de dedos sobre placas de agar.

Tabla 2. *Monitoreo Microbiológico*

Muestra	Método	Instrumentación y/o Referencia
Aire	Impacto sobre agar	*Surface Air System* (SAS) y *Reuter Centrifugal Sampler* (RCS)
	Placas y Frascos de Sedimentación	Placas de Petri de 90 mm de diámetro y 14 mm de altura con tapa, preferentemente de poliestireno cristal, esterilizadas por radiación gamma. Pueden obtenerse listas para usar conteniendo el agar o llenarse en forma aséptica en el laboratorio de uso. En forma similar se pueden usar frascos con medio líquido.
Superficies	Hisopado	Pueden ser simplemente hisopos de distintos materiales o kits comerciales que incluyen hisopos más medios de transporte y crecimiento.
	Placa de Contacto	Pueden ser de preparado local, listas para usar, o kits comerciales que proveen no solo la placa, sino también un vial con el medio líquido de cultivo elegido en caso de detectarse una contaminación
	Lavado	Este método permite la toma de muestras de gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente.
Operarios	Monitoreo de vestimenta de laboratorio y guantes por impresión de dedos sobre placas de agar	Este monitoreo permite evaluar el nivel de destreza en técnicas asépticas por parte del personal especializado en manufactura de productos farmacéuticos.

Importancia de un Programa de Monitoreo Microbiológico para Ambientes Controlados [1-5]

El monitoreo del número total de partículas, aun cuando se realice con instrumentación electrónica sobre una base continua, no provee información sobre el contenido microbiológico de ese ambiente. La limitación básica de los contadores de partículas es que ellos miden partículas de un tamaño 0,5 µm o mayor. Los microorganismos ambientales generalmente no se encuentran flotando en el aire libremente o en células simples e independientes, sino que se encuentran agrupados, asociados con partículas de 10 a 20 µm. Más aun, los contadores tradicionales no diferencian entre partículas inertes y microorganismos (células y esporas) flotando en el aire.

El conteo de partículas y el conteo de microorganismos viables dentro de ambientes controlados varían con la localización del muestreo y las actividades que se están desarrollando durante el monitoreo.

Algunas de las características más importantes a tener en cuenta en un programa de monitoreo microbiológico son las siguientes:

1. El programa de monitoreo microbiológico para ambientes controlados debe evaluar la efectividad de las prácticas de limpieza y sanitización realizadas por el personal, que podría tener un impacto en la carga biológica del ambiente.
2. El programa de monitoreo microbiológico de rutina debe proveer suficiente información para asegurar que el ambiente durante la manufactura está operando dentro de un estado de control adecuado.
3. El monitoreo microbiológico ambiental y el análisis de los datos, efectuado por personal calificado, permitirá saber que el estado de control del medio ambiente de manufactura se mantiene bajo control a través del tiempo. El ambiente debe ser muestreado durante una operación normal para permitir la colección de un número significativo de datos. Los muestreos deben ocurrir con los materiales en el área, las actividades de los procesos en funcionamiento, y el personal en su puesto de trabajo y en actividad.
4. El monitoreo, cuando aplique, deberá incluir cuantificación de los muestreos de aire en los cuartos, del aire comprimido que se usa en áreas críticas, de superficies, equipos, recipientes contenedores, pisos, paredes y ropa del personal.
5. El objetivo del programa es obtener una estimación representativa de la bio-carga del ambiente. Cuando se cuente con un número representativo de datos, se analizarán y se evaluarán tendencias de los mismos por parte de personal entrenado en el tema. Así como es importante revisar los resultados con una frecuencia corta periódica determinada, también es crítico revisarlos con una base extendida para ver si hay tendencias. Las tendencias pueden ser visualizadas mediante la construcción de cartas de control estadístico que incluyan niveles de alerta y acción.
6. Cuando se excedan los niveles, debe revisarse la documentación relacionada y realizarse una investigación. La investigación debe incluir la revisión de la documentación del mantenimiento del área, documentos de sanitización, parámetros operacionales y físicos, tales como humedad relativa y temperatura de los cuartos implicados, como así también el estado de entrenamiento del personal involucrado. Las acciones a tomar como consecuencia de la investigación pueden ser tales como reforzar el entrenamiento del personal, enfatizar el control ambiental de algunos cuartos, muestreos adicionales, incremento de la frecuencia de controles, aumento del número de producto a analizar, identificación de los microorganismos involucrados y sus posibles fuentes, evaluación de la necesidad de re-evaluar los actuales procedimientos estándar y su re-validación, si fuera necesario. La investigación y el racional que avalen las acciones a tomar deben ser documentados e incluidos como parte del sistema de gerenciamiento de la calidad.
7. Un ambiente controlado es definido por certificación correspondiente a una operación estándar. Los parámetros que son evaluados incluyen integridad de filtros, velocidad del aire, patrones de aire, renovaciones de aire y presiones diferenciales. Estos parámetros pueden afectar la bio-carga microbiológica del ambiente. El diseño, construcción, y las operaciones, pueden variar mucho entre distintas empresas, haciendo difícil generalizar requerimientos para estos parámetros.

Tabla 3. *Referencias regulatorias*

Referencias Regulatorias	Contenido
Código de Regulaciones Federales Título 21 (21 CFR Part 211) USA[9]	El Título 21 (Alimentos y Drogas), Parte 211 (Prácticas de buena producción de productos farmacéuticos ["*Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals*"]) del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica describe en sus diferentes secciones los requerimientos a seguir en la manufactura de productos medicinales. Algunas de las secciones siguientes son de importancia para el monitoreo ambiental, y para el microbiológico en particular (ver a continuación)
21 CFR 211.113 (a) (b)	Esta sección del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica está dedicada al control de la contaminación microbiológica estableciendo la necesidad de contar con procedimientos escritos apropiados que definan la prevención de microorganismos "objetables" en los medicamentos no estériles, y de contaminación microbiológica general en los medicamentos estériles.
21 CFR 211.46	Esta sección está dedicada a la calidad del aire, sistemas de ventilación (HVAC) filtración, calentamiento y refrigeración, diferencias de presión, cantidad o ausencia de microorganismos, partículas, humedad y temperatura, requeridos en el área de producción de medicamentos.
Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report No. 13 [10-11]	El PDA *Technical Report* No.13, "*Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program*" detalla los métodos de monitoreo y el modo de establecer límites de alerta y acción y cómo reportar resultados
PhRMA Task Force Report on Environmental Monitoring in Non-Sterile Manufacturing Areas [12]	Una referencia útil que define las prácticas más básicas del monitoreo ambiental para la manufactura de productos no-estériles y la frecuencia con que se deben tomar muestras del medio ambiente.
Disposición 2372/08. ANMAT .Argentina [6-7] "Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos" y la "Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación".	Anexo I: "Guía para Inspectores sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos" en el Capítulo 10: Producción. Ítem: Operaciones - Productos estériles - Se indica la necesidad de: *Procedimientos operativos para el control microbiológico de áreas limpias y controles ambientales en dichas áreas a intervalos predefinidos. Monitoreo microbiológico de áreas donde se realicen operaciones asépticas y existencia de los registros correspondientes*. En el Anexo II "Clasificación de Deficiencias de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación". Ítem Inhibición de la línea / área / lote. Se procederá a la inhibición cuando: <u>PRODUCCION - Productos no Estériles</u>: Falte monitoreo microbiológico y ambiental en áreas donde se elaboran productos no estériles cuando el producto lo requiere. <u>PRODUCCION - Productos Estériles</u>: Falte monitoreo microbiológico y ambiental en áreas donde se elaboran productos estériles. Falte monitoreo microbiológico y ambiental en cada operación aséptica. Ambientes no clasificados y no controlados donde falte monitoreo de microorganismos viables durante la elaboración de productos de llenado aséptico. Uso de vestimenta no exclusiva en las áreas de ambiente controlado.

Objetivos de un Programa de Monitoreo Microbiológico

En general, el propósito de un programa de monitoreo microbiológico incluye los siguientes puntos [8]:

- Provee información crucial sobre la calidad del medio ambiente durante la manufactura.
- Previene contaminaciones microbianas durante las futuras campañas de manufactura, gracias a la detección de cambios significativos en la presencia bacteriana durante los estudios de seguimiento.
- Previene la liberación de lotes de producto potencialmente contaminados que no cumplen con los estándares establecidos.
- Previene el riesgo de una infección del paciente que recibe un producto farmacéutico contaminado.
- Asegura la implementación de controles de monitoreo ambiental en las diferentes áreas de producción.
- Provee un panorama de la limpieza de los ambientes de producción sirviendo como una herramienta para medir la efectividad de las medidas sanitarias adoptadas en la planta de manufactura.

Un programa de monitoreo microbiológico debe también cumplir con requerimientos definidos en diferentes documentos regulatorios como se detallan en la Tabla 3.

Programa de monitoreo microbiológico dentro del programa general de monitoreo ambiental [1-5]

El programa de monitoreo microbiológico es uno de los elementos más críticos del monitoreo ambiental. Este programa es responsabilidad del área de control de calidad. Tendrá una frecuencia y alcance que dependerá del riesgo de contaminación microbiológica involucrado en la actividad.

El programa de monitoreo debe realizarse cumpliendo con los requisitos gubernamentales y las agencias regulatorias. El sistema debe incluir:

- Medios de cultivo calificados capaces de cumplir con la detección de bacterias y hongos, y asegurar la detectabilidad de los microorganismos después de las condiciones de exposición y a través de la vida útil del medio.
- Requerimientos para el flujo del personal, equipos y materiales de áreas monitoreadas, como así también, accesos controlados de personal a cuartos críticos.
- Sistema apropiado de almacenamiento de equipos cuando no se usan.
- Procedimientos escritos indicando los lugares de muestreo con un grado de precisión tal que permita muestreos reproducibles.

El plan de muestreo debe indicar:

- Frecuencia del muestreo.
- Momento en que las muestras son tomadas,
- Duración del muestreo.
- Tamaño de la muestra.
- Lugares donde se toma la muestra (visualizados en un plano)
- Técnica y equipo de muestreo. Los equipos de muestreo de aire activos deben ser tales que sean aptos para trabajar en ambientes asépticos, con muestreos eficientes, limpios, sin interrupción del flujo de aire y capaces de ser esterilizados.
- Niveles de alerta y acción.
- Respuesta apropiada frente a desviaciones a los niveles de alerta y acción.
- Clasificación de áreas.
- Requerimiento para la identificación de los microorganismos aislados.
- Requerimiento para los estudios de tendencias.

El plan de muestreo debe ser justificado con datos que lo soporten.

Aquellas áreas que hayan perdido temporalmente su estado de "bajo control microbiológico" debido a un evento esperado o no, deben tener un procedimiento y/ o control de cambio para retornar a su estado controlado.

Para áreas con presiones diferenciales debe haber monitoreo al menos en cada turno en cuartos de llenado, áreas asépticas y áreas perimetrales a las controladas. Las presiones diferenciales de aire deben ser monitoreadas antes y después de completados los testeos de esterilidad.

La recuperación normal de presiones diferenciales entre cuartos debe ser determinada con un mecanismo que responda a las excursiones.

Establecimiento de un Sistema de Clasificación de Áreas de Producción:

Las áreas de soporte y las áreas críticas de operaciones de producción y las de análisis de ensayos de esterilidad deben ser calificadas cuando aplique. Esta calificación debe ser soportada por datos microbiológicos y de partículas obtenidos durante los estudios de calificación.

La clasificación de áreas debe generar datos en condiciones de descanso (sin operación) y en condiciones dinámicas (en operación).

Excursiones/ Acciones correctivas/ Plan de remediación:

Cada compañía debe definir claramente las circunstancias bajo la cuales debe aplicar un plan de acciones correctivas/remediación y documentar cuando el área ha vuelto a estado de control.

Monitoreo de manufactura y áreas de control microbiológico. [1-5]

El monitoreo del área de manufactura debe realizarse en condiciones dinámicas. Los monitoreos en condiciones de descanso pueden realizarse cuando sea parte de un proceso de estudio de la eficiencia del monitoreo o seguimiento del mismo, cuando un área es puesta en producción después de un tiempo de inactividad, o cuando alguna guía regulatoria lo disponga.

Los equipos de monitoreo de tipo cuantitativos deben tener en cuenta el volumen de aire tomado/ superficie barrida. Algunos expertos indican que las placas de sedimentación sería conveniente dejarlas para cuando sean solicitadas por algún agente regulador o para estudios no cuantitativos.

Cada compañía deberá definir la criticidad de sus operaciones y el lugar donde estos procesos se realizan. Las frecuencias de muestreos, los lugares y el tiempo debe ser establecido en función de las operaciones que se realizan. Los lugares son elegidos teniendo en cuenta el riesgo de contaminación del producto.

El monitoreo de superficies y de partículas viables en el aire debe ser lo más próximo a la operación crítica, pero sin por ello interferir con la protección del producto.

Una evaluación debe ser llevada a cabo para determinar si es necesario la investigación de microorganismos anaeróbicos.

La temperatura y humedad relativa deben ser monitoreadas con la frecuencia según corresponda a la operación realizada.

Los monitoreos relacionados con la producción aséptica incluyen:

- Monitoreo de todas las operaciones asépticas.
- Muestreo de partículas viables y no viables en el aire, muestreo de superficies y del personal.
- Monitoreo de los sitios de llenado.
- Monitoreo de viables en forma continua mediante placas de sedimentación que se extiendan desde el inicio hasta el final de la operación.
- Monitoreo activo de viables en forma intermitente, reflejando la longitud de la operación al menos una vez por turno. Cuando los equipos de muestreo activo de viables pudieran afectar la zona de protección de cabinas

de seguridad biológica o flujos laminares, realizar estos controles antes y después del llenado, pero no durante esta operación.

Los guantes y la ropa del personal que trabaja en áreas asépticas críticas deben ser monitoreados. El lugar, la frecuencia y el número de muestras debe ser definido en base al riesgo de contaminación, pero se sugiere al menos un monitoreo de dedos de cada guante por cada turno y el control de ropa al menos con base diaria. Es importante asegurar que los guantes no hayan sido sanitizados antes del muestreo, como así también que no queden trazas de medios de cultivo en los guantes después de ser muestreados.

Monitoreo de áreas no productivas, de soporte, o del laboratorio. [1-5]

La frecuencia y lugar de muestreo se determina en función de la clasificación del área, uso y diseño de las instalaciones. Los controles incluyen monitoreo de viables y no viables en el aire, muestreo de superficies y del personal.

Las áreas que no son activamente de procesos ni de controles microbiológicos deben ser regularmente, limpiadas, sanitizadas y monitoreadas.

Selección de los sitios de muestreo [11]

Cada proceso debe ser cuidadosamente evaluado cuando se seleccionan los sitios de muestreo. El objetivo del muestreo es proveer datos que sean útiles para ayudar a identificar problemas de contaminación actuales o potenciales asociados con procedimientos específicos, equipos, materiales, procesos. Se debería muestrear aquellos lugares que, en caso de contaminarse, contaminarían el producto. Sin embargo, puede ser prudente seleccionar sitios próximos pero no en contacto con el producto.

Algunas preguntas que nos pueden ayudar a seleccionar los sitios de muestreo serían:

¿A cuáles sitios una contaminación microbiológica podría afectar adversamente la calidad del producto?

¿Cuáles sitios tendrían mayor probabilidad de alta proliferación microbiológica durante en el actual proceso de producción?

¿La selección debería involucrar un diseño estadístico (por ejemplo, Federal Standard 209E)?

¿Deberían algunos sitios de monitoreo ser rotados?

¿Cuáles sitios son los más inaccesibles o difíciles de limpiar, sanitizar o desinfectar?

¿Qué actividades en el área contribuyen a dispersar la contaminación?

¿Podría el acto de muestreo generan disturbios ambientales que generaran datos erróneos o contaminar el producto?

¿Debería el muestreo realizarse exclusivamente al final del turno?

Fuentes que están en contacto con el producto puede ser muestreados, por ejemplo: gases comprimidos, aire de los cuartos, equipos de manufactura, herramientas, superficies críticas, contenedores de almacenamiento, cintas transportadoras, guantes del personal, agua. Entre las fuentes que no están en contacto con el producto podemos citar: paredes, pisos, techos, puertas, sillas, pass-throught.

Frecuencia de muestreo [11]

Los requerimientos de muestreo pueden variar dependiendo de factores tales como tipo de proceso de manufactura y tipo de producto, diseño de las instalaciones, cantidad de recurso humano interviniente, tipo de esterilización involucrada, tipo de liberación (mediante test de esterilidad o paramétrica), perfiles históricos de datos de monitoreo ambiental. Cambios en la frecuencia, temporarios o permanentes, puede ser necesario en base a cambio de prácticas, requerimientos de compendio, desarrollo de tendencias, adquisición de nuevos equipos, o construcción de nuevas áreas o utilidades. La clave para la correcta elección de la frecuencia de monitoreo es poder identificar potenciales deficiencias del sistema.

Antes de implementar una reducción en la frecuencia de muestreo, el personal de Aseguramiento de la Calidad deberá estudiar el resumen de los datos históricos junto con la actual frecuencia de muestreo y la nueva propuesta. Después de un tiempo de implementada la nueva frecuencia deberá estudiarse si el cambio fue apropiado.

Niveles de alerta y acción [1-5,11]

Los niveles de alerta y acción se establecen para áreas calificadas. Niveles de alerta y acción deben ser determinados y deben incluir límites para el monitoreo del personal.

La importancia del resultado individual de cada muestra surge de compararla con los límites de alerta y acción establecidos. El promedio de resultados de un mismo lugar de muestreo sólo es posible cuando se realizan tendencias. No es apropiado promediar resultados individuales de distintos lugares de muestreo.

El nivel de alerta se establece en base al análisis de datos históricos. Los niveles de acción se inician basándose en guías regulatorias y posteriormente en base a los análisis de datos propios históricos cuantificables. Los niveles de alerta y acción deben tener su justificación estadística.

Una re-evaluación anual de los niveles de alerta y acción debe realizarse y documentarse.

Dado que no hay consenso acerca del mejor mecanismo para establecer niveles, los siguientes son aproximaciones que ha usado la industria farmacéutica con éxito:

a. Aproximación al Valor *Cut- off*: Todos los datos obtenidos para un determinado sitio son ubicados en un histograma. Los niveles de alerta y acción son establecidos como aquellos resultados de monitoreos que resultan respectivamente del 1% y 5% mayor que el nivel establecido para ese sitio. Se trabaja con no menos de 100 resultados de monitoreo y el percentil 95 y 99 establecen el nivel de alerta y acción.

b. Aproximación a la Distribución Normal: Esta aproximación es mejor para recuentos altos (para bajos recuentos se usa Distribución Poisson). El promedio y la desviación estándar de los datos son calculados. Los niveles de alerta y acción son el promedio más 2 y 3 veces las desviaciones, respectivamente.

c. Aproximación a los Límites de Tolerancias No Paramétricos: Los niveles de alerta y acción son establecidos usando métodos no paramétricos (distribución libre). Esto es útil para datos de monitoreo ambiental que tienen una distribución no normal, por ejemplo, presentan altos niveles de asimetría hacia recuentos cero.

d. Otros modelos se basan en la binomial negativa, Poisson, Weibull o distribuciones exponenciales. Típicamente, la contaminación en ambientes estrictamente controlados no cae dentro de una distribución normal.

Revisión de los datos [11,55]

Varias actividades son parte de esta revisión, tales como la recolección de los datos, su análisis, aproximación usada para el análisis, e interpretación de los mismos definiendo el criterio y la forma en que se arribó a las conclusiones. La revisión de rutina de los datos es fundamental para ayudar a la estabilidad de los procesos y su funcionamiento bajo control.

Es recomendable utilizar un número importante de muestras y un sistema computarizado de manejo de datos. Antes de la implementación, todas las aplicaciones de la base de datos deben ser validadas y calificadas para el sistema computarizado específico que haya sido elegido.

Análisis de los datos [55]

Las tendencias de los monitoreos ambientales son a menudo dificultosas de obtener y reconocer, debido al bajo número de colonias obtenido en los resultados. Los histogramas son una herramienta útil para ver cuál es la frecuencia más común donde caen los resultados. Diferentes clasificaciones de cuartos con diferentes requerimientos producirán diferentes histogramas. Un modelo matemático debe ser aplicado no sólo con este objetivo en mente sino también para el tipo de datos a ser analizados.

En áreas grado A (ISO 5) donde los límites de acción típicos puede ser 1 UFC (Unidad formadora de colonia) no es fácil establecer tendencias. En estos casos, más que una tendencia pura de datos puede calcularse el rango tope conocido como "rango *hit*", por ejemplo, qué tan común es encontrar un recuento dividido el número de muestras tomadas. En este ejemplo, si el *hit rate* se incrementa, deberíamos pensar que se produce una tendencia adversa. Si el *hit rate* decrece, el ambiente estará más limpio.

Puntos a considerar durante la revisión de los datos [11,55]

Cuando los datos están siendo analizados, es importante conocer cómo será conducida la evaluación. Por ejemplo, un método generalizado que puede ser usado es:

a. Determinar el objetivo del análisis: por ejemplo, análisis de los datos de un sitio, examen de la desviación de los datos microbiológicos, evaluación de qué tan apropiados son los niveles de acción establecidos, actualizaciones, etc.

b. Especificidad de los datos a ser analizados: por ejemplo, una semana, un mes, sólo los datos de un sitio específico.

c. Aplicación de histogramas u otras herramientas para conocer la naturaleza de la distribución. También puede servir para conocer patrones o valores extremos no comunes. (*outliers*)

d. Observar la distribución y procesar con el modelo matemático apropiado. Si los datos caen dentro de una distribución normal, un modelo matemático paramétrico puede ser usado. Si los datos no son consistentes con una distribución normal, debe utilizarse una aproximación no paramétrica.

e. En el ejemplo que sigue, un nivel de acción al percentil 99% es utilizado. Consistente con el nivel de acción 99% son los siguientes modelos matemáticos (PDA, 2001). Los modelos pueden ser sólo aplicados si las características de los datos asumen una distribución definitiva.

Nivel de acción estimado de un conjunto de datos que reflejan una distribución exponencial o no normal: 4,6 x promedio en cfu.

Nivel de acción estimado de un conjunto de datos que reflejan una distribución normal: .2,33 de la desviación standard + promedio en cfu.

Interpretación de los datos [11]

Todos los datos generados deben ser resumidos y evaluados para determinar si el ambiente de producción está bajo control. El control estadístico de procesos es uno de los métodos para realizar esta evaluación.

Caracterización de los microorganismos aislados

Para áreas Clase ISO 5, Grado A/B y el personal asociado, todos los microorganismos aislados deben ser identificados hasta nivel de especie.

Para áreas Clase ISO 7, Grado C, e ISO 8, Grado D: Cuando los niveles de acción son excedidos o hay tendencias con los niveles de alerta, las aislaciones deben ser identificadas al nivel de especie.

Un nivel de acción es equivalente a una tendencia en los niveles de alerta.

Si la identificación hasta especie falla, identificar hasta género.

El área de calidad debe tener documentado el perfil de los microorganismos típicamente aislados en cada área y un procedimiento para proceder cuando se encuentran microorganismos atípicos.

Aisladores para realizar el testeo de esterilidad o procesos asépticos

El interior de un aislador debe ser ISO 5, Grado A.

El muestreo de aire y superficie seguirá las frecuencias de monitoreo correspondientes a operaciones asépticas.

El monitoreo ambiental para la manufactura de productos esterilizados terminalmente debe ser realizado como si fuera una operación aséptica.

Tendencias

El área de Calidad es responsable de proveer rutinariamente las tendencias de resultados correspondientes a largos y cortos períodos de tiempo.

El área de Calidad debe realizar un reporte con resultados de investigaciones, seguimientos relacionados con acciones provenientes de niveles de alerta y acción. Es conveniente tener un programa con estos datos y gráficos de los resultados.

El reporte debe ser realizado con una base mensual en el caso de áreas y personal de áreas críticas, y en base trimestral para otras áreas. Un análisis de datos en base anual también es recomendable debido a diferencias de la flora microbiana durante los cambios estacionales. El reporte debe estar basado en parámetros tales como lugar, turno, lote, cuarto y operador. Debe indicar si ha habido cambios en la flora microbiana. En caso de tendencias adversas, el reporte debe indicar el plan de acciones correctivas.

Entrenamiento del personal

El entrenamiento del personal que trabaja en áreas controladas es crítico. El entrenamiento también es igualmente importante para el personal responsable por el programa de monitoreo ambiental.

En operaciones altamente automatizadas, el personal monitoreado puede ser el que está más directamente en contacto con las zonas críticas.

El muestreo microbiológico tiene un alto potencial de contribución a una contaminación debido a una inapropiada técnica de muestreo. Un programa de entrenamiento en este tema es requerido para minimizar el riesgo. Debe documentarse un entrenamiento formal del personal, incluyendo procedimientos operacionales estándar muy detallados. El personal que opera en ambientes controlados debe tener conocimientos en principios microbiológicos relevantes. Entre los temas se incluyen: principios básicos en procesos asépticos, relación de la manufactura y los procedimientos de manipuleo de fuentes potenciales de contaminación de los productos; principios básicos de microbiología, desinfección y sanitización; preparación y selección de medios de cultivo, esterilización. El personal del laboratorio dedicado a las identificaciones microbiológicas debe tener entrenamientos de formación en estas prácticas y de actualización.

Deben incluirse entrenamiento en buenas prácticas de manufactura (GMP), conducción de investigaciones y análisis estadístico de datos.

Dado que el personal es la principal causa de contaminación es fundamental contar con personal entrenado.

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en el aire.
Métodos tradicionales.

Es sabido que los microorganismos presentes en el aire en un ambiente pueden afectar a la calidad microbiológica de los productos manufacturados o llenados en esas áreas. También es cierto que la medición de los microorganismos presentes en esas áreas puede ser afectada por los instrumentos y procedimientos involucrados. Por lo tanto, cuando se utilizan métodos o equipos alternativos es necesario establecer una equivalencia de resultados.

Actualmente los muestreadores más comúnmente usados son los de impacto y centrífugos. A continuación se describen los métodos y equipos tradicionalmente usados:

Muestreador de impacto: Este instrumento es más comúnmente conocido por su nombre en inglés, STA, *slit -to – agar* (de la rendija a la placa de agar). Método sumamente eficaz, una tecnología comprobada y de confianza. Es el muestreador que suele usarse como referencia en las farmacopeas cuando se sugieren límites de colonias para las distintas áreas controladas. El muestreador imprime a una placa con agar una rotación de 360°, mientras lo

mantiene a una distancia fija respecto de una rendija cortada con láser, una característica crucial para garantizar una máxima recuperación validada de los organismos que chocan con la superficie del agar. El aire entrante impacta en la placa de agar nutritivo. La placa con agar se incuba para permitir el crecimiento de los microorganismos. A menudo se utiliza una entrada remota del aire para minimizar disturbios del flujo laminar del aire del área controlada.

*Muestreador por impacto Sieve***.** Consiste en un dispositivo diseñado para alojar a la placa de Petri conteniendo agar nutritivo. La tapa de la unidad es perforada con orificios de tamaño pre-establecido. Una bomba de vacío permite el paso de un volumen conocido de aire a través de la tapa. Las partículas del aire conteniendo microorganismos impactan en el agar. Algunos muestreadores disponen de una serie de tapas en forma de cascada con perforaciones decrecientes en tamaño. Estas unidades permiten separar por tamaño a las partículas conteniendo microorganismos en función del tamaño de poro.

*Muestreador Centrífugo***.** La unidad consiste en una hélice o turbina que ingresa un volumen conocido de aire hacia la unidad y lo hace impactar tangencialmente sobre una tira plástica flexible conteniendo agar nutritivo.

Muestreador Esterilizable Atrium (Sterilizable Microbiological Atrium -SMA). Es una variante del muestreador por impacto Sieve ("*sieve impactor*") en que el aire es aspirado a través una tapa perforada sobre una placa de Petri. La tapa contiene orificios uniformemente espaciados En la base de la unidad se coloca la placa de Petri conteniendo agar nutritivo. Una bomba de vacío controla el movimiento de aire a través de la unidad.

Muestreador de sistema de aire a superficie de agar. La unidad tiene una sección de entrada en donde se acomoda una placa de contacto conteniendo agar. Inmediatamente detrás de la placa hay un motor y turbina que moviliza el aire a través de una tapa perforada que cubre el agar.

*Muestreador de filtro de gelatina***.** La unidad consta de una bomba de vacío con una manguera extensible que finaliza en un recipiente donde se coloca un filtro y que puede ser localizado en forma remota en zonas críticas. El filtro es de fibra de gelatina, capaz de retener los microorganismos. Después de un tiempo específico de exposición, el filtro es asépticamente removido y disuelto en un apropiado diluyente. El diluyente es vertido sobre agar nutritivo y puesto a incubar. Alternativamente, el filtro de gelatina puede ser transferido en forma directa sobre una placa de TSA solidificado y se incuba de acuerdo al protocolo.

*Placas de sedimentación***.** Este método es el más comúnmente usado por ser simple y económico. Es útil para evaluaciones cualitativas y para tiempos de exposición prolongados. No es conveniente para evaluaciones cuantitativas de ambientes críticos. Las placas suelen ser de poliestireno cristal, esterilizadas por radiación gama. Generalmente son de 90 mm de diámetro y 14 mm de altura, aunque las hay de 55 mm de diámetro. Placas de 150 mm pueden ser utilizadas para muestreo por sedimentación (*settling*). Pueden ser utilizadas con medio de cultivo agarizado o alojar un *pad* absorbente de celulosa pura, estéril, que actúa de soporte de un medio de medio de cultivo líquido. Pueden comprarse listas para usar o agregarles el medio de cultivo bajo condiciones asépticas en el lugar de uso. El medio de cultivo elegido dependerá de los microorganismos que se busquen controlar.

Una de las limitaciones de los muestreadores mecánicos de aire es el tamaño de la muestra tomada. Esto es más relevante cuando los resultados esperados del área son de muy bajo recuento de colonias. El muestreador *slit-to-agar* tiene una capacidad de muestreo de 80 litros/ minuto, lo que implicaría que, si se busca muestrear un metro cúbico de aire será necesario muestrear durante 15 minutos. Habrá veces que será necesario muestrear más volumen de aire por lo que se requerirán tiempos superiores a 15 minutos. Si bien estos muestreadores tienen capacidad para muestrear rangos altos de volumen habrá que considerar las posibilidades de interrupción del flujo laminar en áreas críticas o la generación de turbulencias que podrían aumentar el riesgo de contaminación.

En el caso de los muestreadores centrífugos, un número importante de estudios muestran que tienen preferencia por las partículas grandes. Este tipo de muestreadores podrán generar resultados más altos debido a esta selectividad inherente. Cuando se seleccione un muestreador centrífugo, habrá que considerar si se afecta la linealidad del flujo de aire. Se podrá entonces usar tubos extras que permitan aumentar la distancia a la zona crítica. Pero nuevamente, habrá que evaluar si estas extensiones no afectan la linealidad del aire. De no haberse salvado la dificultad, habrá que introducir un factor de corrección en los resultados.

Metodología e instrumentación para la cuantificación de microorganismos viables en superficie. Métodos tradicionales

Otro punto a tener en cuenta en el programa de monitoreo microbiológico ambiental es el control de las superficies de equipos, facilidades y personal. Los métodos de control de superficies no han sido tan estandarizados como lo fueron los de aire. Con el objeto de afectar lo menos posible el desarrollo de operaciones críticas, los controles de superficie de rutina se suelen realizar una vez finalizada la tarea la operación. Sin embargo, en situaciones especiales tales como validaciones e investigaciones se amplían estos muestreos y se incluyen controles antes y durante la operación.

El control de superficies generalmente se realiza en lugares que pueden tener contacto con el producto o áreas adyacentes a estas primeras.

Los dos métodos más utilizados son el método de placa de contacto y el de hisopado.

*Placas de Contacto***.** El uso de placas de contacto conteniendo medio agarizado con nutrientes es elegido cuando las superficies a controlar son superficies regulares. Se realiza una presión controlada del agar de la placa sobre la superficie y esa misma placa se incuba por un tiempo y temperatura controlada. Las placas pueden usarse con distintos medios de cultivo, dependiendo la elección del tipo de control que se busque realizar. Las placas pueden comprarse listas para usar o agregarles el medio bajo condiciones asépticas en el lugar de uso. El medio de cultivo puede ser preparado en el lugar de uso, o es posible comprar *kits* comerciales que contienen viales de distintos medios estériles dosificados para llenar una placa o varias según le convenga al usuario.

Hisopado. El método de hisopado es elegido cuando las superficies a muestrear son irregulares. El hisopo, una vez pasado por la superficie, es colocado en un diluyente apropiado, y la estimación de microorganismos es realizada por plaqueo de una alícuota en agar nutritivo. La superficie a muestrear es previamente establecida. Generalmente se muestrean superficies de entre 25 a 30 cm^2. Los hisopos pueden ser de distintos materiales, tales como algodón, dacrón, alginato de calcio, etc. Los mangos son generalmente plásticos ya que en la industria farmacéutica se busca evitar el uso de mangos de madera. Existen también *kits* comerciales que proveen un hisopo que se pasa por la superficie a controlar y luego es introducido en un blíster dejando que entre en contacto con el gel reactivo. Una vez realizada esta operación, se introduce dentro de la incubadora durante aproximadamente 16 horas y se comprueba la presencia o ausencia de microorganismos observando el cambio de color de la sustancia.
Existen distintos tipos de *kits* de control microbiológico: Generales, que detectan ausencia o presencia de microorganismos, y Específicos para la detección de determinados microorganismos tales como estafilococos, coliformes, salmonella, etc.
Ambos métodos, hisopado y placas de contacto tienen baja capacidad de recuperación, según se observa en estudios de validación.

Lavado. Este método permite la toma de muestras de una gran superficie, de zonas que son inaccesibles o que no pueden ser desmontadas rutinariamente. Las muestras de enjuague pueden entregar evidencia suficiente de una limpieza adecuada cuando la accesibilidad a las piezas de los equipos impide el muestreo directo de la superficie. Puede ser útil para verificar la eliminación de residuos de los agentes de limpieza o la presencia de contaminación microbiana.
El método consiste en hacer pasar un diluyente, como por ejemplo agua peptonada al 0.1% por la superficie a controlar. Tomar una alícuota de ese diluyente y sembrarlo en placas de Petri, incubando un juego de placas a temperatura de proliferación de bacterias y otro juego a temperatura de crecimiento de hongos. También puede convenir que en lugar de plaquear una alícuota de enjuague se haga pasar un volumen importante de diluyente por una membrana filtrante y sea esta membrana la que se incube en los medios y a las temperaturas adecuadas.

Film Flexible. Son placas de un material flexible, que favorece el monitoreo de las superficies. Los *films* pueden contener medios generales o especiales con agregados de agentes selectivos, nutrientes, agentes gelificantes, indicadores cromogénicos que facilita la detección de las colonias para la identificación/ cuantificación de las mismas. Luego de la incubación, los films pueden leerse directamente o a través de un lector en forma automática.

Métodos No Tradicionales y Rápidos para el Monitoreo Ambiental Microbiológico

Como se discutiera anteriormente, el monitoreo ambiental microbiológico de las instalaciones dedicadas a la manufactura farmacéutica provee la información necesaria que asegura un control de la producción de acuerdo a las normas regulatorias vigentes. Como se discutiera en las secciones precedentes, existe una amplia variedad de métodos tradicionales de ensayo que se emplean para el monitoreo y están resumidos en la Tabla 4. Los métodos utilizados tienen que estar claramente documentados, incluyendo los niveles de alerta y acción apropiados. Los límites para monitoreo ambiental microbiológico y de partículas no-viables se pueden encontrar en documentos publicados por la Organización Mundial de la Salud [4].

Tabla 4. *Métodos de control de aire y superficies.*

Tipo de Ensayo	Método Tradicional
Aire (Activo)	Placa de Impacto
Aire (Pasivo)	Placa de Sedimentación
Superficies	Placa de Contacto
Superficies	Lavado y Plaqueo
Superficies	Hisopos
Personal – Superficie	Placas Rodac

El monitoreo provee datos referentes al número de partículas totales y el número de partículas microbianas viables en el aire, como así también el número de colonias microbianas presentes sobre superficies variadas, incluyendo también el análisis de la carga biológica aportada por los operarios que trabajan en las zonas bajo control.

El número de partículas en el aire se puede determinar en forma rápida gracias al uso de **contadores de partículas**. Estos instrumentos colectan una cantidad predeterminada de aire y proveen los resultados del número de partículas de acuerdo al tamaño. Los resultados se obtienen en unos pocos minutos de monitoreo permitiendo una respuesta rápida en el caso que en un área particular de manufactura esté presente una alta carga de partículas en el aire. Lo último es muy importante ya que permite cerrar esa área, llevar a cabo la investigación y corregirla lo más rápidamente posible de manera de poder continuar con la producción sin demora. Una respuesta rápida también posibilita que los productos farmacéuticos manufacturados durante el episodio de emergencia puedan ser separados del resto de la producción sin perjudicar el resto.

Desafortunadamente, los resultados correspondientes a los ensayos microbiológicos no se obtienen en forma suficientemente rápida si hay una contaminación con microorganismos viables. Los métodos utilizados en forma tradicional para el monitoreo de microorganismos requieren que estos sean tomados usando un colector de aire, o con el uso de placas de sedimentación, y para superficies con el uso de hisopos, placas de contacto, o por lavado de superficies y plaqueo. En cualquiera de esos casos las placas de muestras deben ser incubadas por un período de tiempo que oscila típicamente entre 3 y 7 días, y recién en ese momento las colonias son contadas y el resultado es comunicado. Este retraso en la comunicación de los resultados ocasiona a su vez un retraso en la toma de acción para solucionar una contaminación haciendo todo tipo de investigación muy difícil. Para el momento en que los resultados son conocidos, el área de manufactura ya ha sido probablemente limpiada y la toma de nuevas muestras no pueden, en la mayoría de los casos, proveer información sobre la causa que originó la contaminación. Debido al hecho que la respuesta a esta contaminación no es suficientemente rápida, la producción corre el riesgo de tener que ser descartada.

Como dijimos, la gran mayoría de estos métodos se basan en el crecimiento del cultivo microbiano en un medio líquido o sólido y bajo condiciones de incubación bien definidas (temperatura, humedad, medio aeróbico o anaeróbico, etc.). Después de uno o más días de incubación, la presencia de contaminación microbiana es detectada por el incremento de turbidez en el medio líquido, o por la presencia de colonias creciendo sobre el medio sólido (agar) una vez que se hacen visibles al ojo humano. Es importante mencionar que los ensayos tradicionales, a pesar de ser lentos debido al tiempo de incubación requerido, presentan varias ventajas. En general son métodos simples, relativamente de bajo costo, y lo suficientemente sensibles como para detectar la presencia de uno o un pequeño número de microorganismos por la observación de colonias sobre el medio sólido después de un período de incubación adecuado. Es también muy importante destacar que los métodos tradicionales son ampliamente aceptados por las autoridades y por las organizaciones de control de calidad farmacéutica.

La Tabla 5 muestra los capítulos más importantes relacionados al control de calidad microbiológico que se encuentran en la farmacopea de los Estados Unidos [1]. Los conceptos generales incluidos en esa farmacopea son también considerados en capítulos correspondientes de la Farmacopea Argentina.

¿Cómo se definen los Métodos Microbiológicos Alternativos y Rápidos?

Durante los últimos 10 años estamos presenciando un crecimiento muy rápido en el número de métodos microbiológicos rápidos aplicables al control de calidad que se están ofreciendo comercialmente a través de una gama variada de vendedores especializados. Este es el resultado de la convergencia de un gran número de avances tecnológicos en áreas tan diversas como biología molecular, nanotecnología, electrónica, imágenes por computación, microinstrumentación, y microfluidos [13]. Los nuevos sistemas para la detección, enumeración, e identificación de microorganismos se han desarrollado en un período de tiempo relativamente corto y están, como se mencionara anteriormente, ya siendo comercializados. Estas plataformas técnicas junto con los reactivos y elementos descartables asociados son conocidas como Métodos Microbiológicos Alternativos y Rápidos, y pueden ser aplicadas para evaluar el control microbiológico en áreas de industrias tan diversas como la farmacéutica, la alimenticia, cosmética, diagnóstico clínico, y bio-defensa [14,15].

En general, las nuevas tecnologías requieren un número menor de células microbianas para la detección, y los resultados se obtienen en un tiempo mucho menor que las técnicas tradicionales. Muy importante de destacar es que algunas de estas tecnologías ofrecen información más precisa y detallada que las técnicas tradicionales, y tienen un diseño más apropiado para la automatización.

Si bien estos métodos pueden ser aplicados al control de calidad microbiológico en prácticamente todos los tipos de muestras de la industria farmacéutica, la discusión que sigue se focalizará en el empleo potencial de aquellos métodos que presentan características más apropiadas para su uso en el monitoreo microbiológico.

Tabla 5. *Lista de capítulos incluidos en las Farmacopeas de los Estados Unidos y Argentina que consideran Monitoreos ambientales*

Cap.	Titulo	Aplicabilidad
<51>	*Antimicrobial Effectiveness Testing*	Formulación de productos medicinales
<55>	*Biological Indicators – Resistance Performance Tests*	Productos estériles. Esterilización terminal
<61>	*Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests*	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<62>	*Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms*	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<71>	*Sterility Tests*	Productos estériles: Ensayos de Esterilidad
<81>	*Antibiotics – Microbial Assays*	Antibióticos
<85>	*Bacterial Endotoxins Test*	Productos estériles: Límites de Endotoxinas bacterianas.
<1035>	*Biological Indicators for Sterilization*	Productos estériles: Esterilización terminal
<1072>	*Disinfectants and Antiseptics*	General
<1111>	*Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products*	Productos no estériles: Límites microbiológicos. Ausencia de Microorganismos objetables.
<1112>	*Application of Water Activity Determination to Nonsterile Pharmaceutical Products*	Productos no estériles y general
<1116>	*Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments*	General, y productos no estériles: Procesos asépticos
<1117>	*Microbiological Best Laboratory Practices*	General
<1207>	*Sterile Product Packaging –Integrity Evaluation*	Productos estériles
<1208>	*Sterility Testing – Validation of Isolator Systems*	Productos estériles: Ensayos de esterilidad, Procesos asépticos.
<1209>	*Sterilization – Chemical and Physicochemical Indicators and Integrators*	Productos estériles: Esterilización Terminal
<1211>	*Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles*	Productos estériles: Procesos asépticos, Filtración, Esterilización Terminal
<1222>	*Terminally Sterilized Pharmaceutical Products – Parametric Release*	Productos estériles: Esterilización Terminal
<1223>	*Validation of Alternative Microbiological Methods*	General, Validación de métodos microbiológicos rápidos alternativos
<1225>	*Validation of Compendial Methods*	General
<1227>	*Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles*	General
<1231>	*Water for Pharmaceutical Purposes*	General
<2021>	*Microbial Enumeration Tests – Nutritional and Dietary Supplements*	Productos no estériles: Límites microbiológicos
<2022>	*Microbiological Procedures for Absence of Specified Microorganisms – Nutritional and Dietary Supplements*	Productos no estériles: Ausencia de microorganismos objetables
<2023>	*Microbiological Attributes of Nonsterile Nutritional and Dietary Supplements*	Límites microbiológicos
Cap. 1020	Buenas prácticas de fabricación y control. Farmacopea Argentina **[5].**	En el ítem 15- Buenas prácticas de fabricación: indica controles microbiológicos periódicos de las áreas donde se procesan productos susceptibles de contaminación y requiere sus correspondientes registros. En el ítem 17- Productos farmacéuticos estériles: indica la necesidad de controles ambientales de aire y superficie de las áreas limpias a intervalos de tiempo preestablecidos para asegurar un ambiente dentro de especificación.

Es importante hacer notar que las técnicas rápidas pueden ser agrupadas en tres áreas según el tipo de resultado obtenido. Los resultados pueden ser (1) cualitativos, es decir que describen si hay o no contaminación en la muestra analizada; (2) cuantitativos cuando se demuestra el número de microorganismos medidos en el ensayo; y (3) identificativos, cuando el método no sólo detecta sino también identifica el contaminante microbiano presente en la muestra.

Las técnicas microbiológicas rápidas también se pueden clasificar de acuerdo a la tecnología básica que emplean para detectar los microorganismos [16]. Estas son: (1) Detección en base a crecimiento o actividad metabólica; (2) Medición de viabilidad; y (3) Detección de un componente celular específico. La discusión de cada uno de los ejemplos de técnicas rápidas aplicadas al monitoreo microbiológico que se desarrolla a continuación se basa en este tipo de clasificación.

(1) Tecnologías Basadas en el Metabolismo Activo y/o Crecimiento

Estas tecnologías miden el crecimiento celular directamente o a través de parámetros bioquímicos o fisiológicos que son indicadores de metabolismo microbiano. En algunos casos las muestras a ensayar son transferidas a medios de cultivo tradicionales o variaciones de los mismos que han sido enriquecidas con una formulación adecuada para favorecer la proliferación de microorganismos. La ventaja más importante de este tipo de sistemas es que permiten la recuperación de los microorganismos para estudios de caracterización e identificación u otros ensayos necesarios en caso de una investigación.

Sistema de Microbiología Rápida Pallchek:

El uso del ensayo de bioluminiscencia basado en el uso de adenosina tri-fosfato (*adenosine triphosphate* o ATP) en la evaluación microbiológica de productos y ambientes farmacéuticos está muy bien documentado y establecido [17]. Pallchek fue una de las primeras tecnologías de microbiología rápida aceptada por los más importantes entes regulatorios, y por esto existen numerosos y diversificados ejemplos de aplicaciones de análisis microbiológico en la industria farmacéutica, cosmética, y alimenticia [18-21].

La reacción de bioluminiscencia que usa luciferina y ATP está catalizada por la enzima luciferasa extraída de la luciérnaga (luciferina 4-monooxygenasa, EC 1.13.12.7), que cataliza la oxidación de D-luciferina en presencia de ATP, iones de magnesio, y oxígeno molecular (Figura 1). La molécula de ATP, que constituye la fuente principal de energía almacenada en las células de todos los seres vivos, es el factor más importante de esta reacción [22]. La reacción produce un *quantum* de luz amarilla de 564 nm por cada molécula de luciferina oxidada [23-24]. La luz producida por la reacción de luciferina-luciferasa es proporcional a la cantidad de ATP usado, y en el caso del Pallchek, es medida in Unidades Relativas de Luz (URL) por un luminómetro portátil. En los ensayos microbiológicos, donde la fuente de ATP usada en la reacción proviene de los microorganismos contaminantes de una muestra farmacéutica. La cantidad de luminiscencia medida en URL puede ser correlacionada al número de células microbianas presentes en la muestra. Esta correlación es linear sobre un margen muy amplio de carga microbiana [25] de un cultivo standard para una cepa bacteriana particular. Cultivos standards de varias especies diferentes en conjunto pueden presentar desviaciones de la linearidad, pero pueden ser útiles en estimar carga bacteriana dependiendo de la aplicación.

Figura 1 *La Reacción de Bioluminecencia Catalizada por la Luciferasa*

El sistema Pallchek consiste en un pequeño luminómetro portátil, *kits* de reactivos, y elementos descartables. Las aplicaciones más comunes de este sistema se basan en la filtración de muestras líquidas a través de una membrana y la medida de la contaminación microbiana retenida sobre esa membrana por bioluminecencia. Para

el monitoreo ambiental se lo puede aplicar para ensayos de agua, superficies (líquidos recuperados de hisopos y lavados), y contaminantes provenientes de muestras de aire recuperadas en medio líquido por el Coriolis (ver más adelante) [26,27].

Como se mencionara previamente, las aplicaciones más comunes comienzan con una filtración de la muestra líquida. Después de este paso, la membrana de filtración es lavada con una solución fisiológica estéril para eliminar cualquier componente presente en la muestra que pueda interferir con la reacción de bioluminescencia, y también cualquier residuo de ATP libre que pueda estar presente en la muestra a analizar. Esto último asegura que en caso de una contaminación, sólo ATP localizado intracelularmente en las células microbianas es detectado. A continuación se agrega un reactivo sobre la membrana que cumple con la función de liberar el ATP localizado en el interior de los microorganismos, y luego se agrega una mezcla de luciferina y luciferasa. La reacción se mide en el luminómetro por la bioluminescencia producida en un tiempo de 10 segundos. Si la muestra se presume que posee una carga bacteriana muy baja, la membrana puede ser incubada en un medio líquido de crecimiento por un período de 6, 12 o más horas. Esta etapa tiene la función de aumentar el número de células contaminantes para permitir la detección en los casos en que sólo una o más células están presentes en la muestra original. El último paso ha sido particularmente útil para el uso de esta metodología en un ensayo rápido de esterilidad, reduciendo el tiempo de incubación de 14 a 4 días **[28]**.

Como se mencionara previamente, el tiempo de detección de una contaminación usando Pallchek es menos de una hora si la muestra es analizada en forma inmediata, o un día o más si la muestra es incubada en medio líquido para aumentar el número de células del microorganismo contaminante a un nivel por sobre el límite de detección del instrumento. En relación a otros instrumentos de microbiología rápida, Pallchek es un sistema de bajo costo, lo cual facilita su implementación. Vale la pena mencionar que este sistema no detecta esporas en forma directa. Si se sospecha contaminación por esporas hace falta efectuar una etapa de activación y enriquecimiento por cultivo de hasta 24 horas antes de realizar el ensayo. En estos casos el análisis es entonces cualitativo.

Uso en monitoreo ambiental: Este método puede ser empleado para el análisis de superficies con muestras provenientes de hisopados o de lavados de superficies. También puede ser empleado para el monitoreo de agua potable y de calidad farmacéutica. Monitoreo de aire es también posible si las muestras son recuperadas en un medio líquido por burbujeo (ver la sección dedicada a Coriolis más adelante).

BacTAlert:

Este sistema fue uno de los primeros métodos rápidos en salir al mercado. El modelo BacT/Alert 3D Dual-T es completamente automatizado y tiene la capacidad de detectar contaminaciones microbianas a dos temperaturas diferentes, 32.5 °C y 22.5 °C [29]. Una aplicación pionera de este sistema fue su uso en un método rápido de esterilidad en para productos de terapia celular que poseen una vida media muy corta [30]. En este sistema, el CO_2 producido durante el crecimiento de microbios contaminantes es detectado a través de unos detectores muy sensibles a los cambios de pH que se encuentran incorporados en la botella que contiene el medio de cultivo. Estos sensores cambian de color en proporción a la cantidad de CO_2 producido por el crecimiento de los microbios contaminantes. El cambio de color del sensor es a su vez detectado por un elemento que traducirá estas señales en unidades de reflexión. La sensibilidad del sistema es aproximadamente 1 UFC/ ml. En una evaluación de este sistema por uno de los autores se encontró que ciertos cultivos bacterianos ambientales de crecimiento lento no eran detectados por este instrumento. Aparentemente el "software" necesitaba una calibración más sensible para aceptar cambios de color que ocurren muy lentamente en un período de tiempo relativamente largo. Este problema parece haber sido solucionado en versiones más recientes del instrumento. En general, el tiempo de detección de una contaminación usando BacTAlert es aproximadamente un 50% más corto que el tiempo tradicional. Debido a que el costo de este sistema es relativamente alto, es necesario hacer un análisis económico muy cuidadoso de retorno de inversión para justificar su compra y uso en aplicaciones de monitoreo.

Uso en monitoreo ambiental: Este método puede ser empleado para el test de superficies con muestras provenientes de hisopados o de lavados de superficies. También puede ser empleado para el monitoreo de agua potable y de calidad farmacéutica.

Growth Direct, Rapid Micro BioSystems:

Este sistema permite una enumeración de colonias microbianas mucho más rápidamente que el método convencional basado en la observación directa de las placas de agar por el analista [31,32]. El sistema usa tecnología de imágenes digitales y microscopia para observar la aparición de microcolonias sobre la placa de agar, en un tiempo mucho más corto que la observación visual. Generalmente, esta metodología posibilita la obtención de un resultado en la mitad del tiempo empleado por la técnica convencional. El método no destruye los microorganismos por lo cual, en caso de un resultado positivo, permite la caracterización e identificación del contaminante en pasos posteriores. El sistema es completamente automático y de grandes dimensiones. Debido a su similitud con el método tradicional (está basado en la detección de colonias creciendo sobre medio sólido y usa similares medios de cultivo y condiciones de incubación) su aceptabilidad por los entes regulatorios está significativamente facilitada. El costo del instrumento, como así de los elementos descartables, es muy importante. Se puede sin embargo encontrar una justificación en el caso de un laboratorio con un nivel de ensayos diarios muy grande, o aplicaciones farmacéuticas muy especiales [33].

Uso en Monitoreo Ambiental: Este sistema es aplicable a todos los casos de análisis microbiológicos donde el método tradicional está basado en la enumeración microbiana por conteo sobre placas de agar.

(2) Tecnologías Basadas en Medición de Viabilidad

Los métodos basados en viabilidad celular, también conocidos como métodos de medición directa, no requieren crecimiento celular para la detección de microorganismos. Los métodos más conocidos dentro de esta categoría están basados en el uso de marcadores fluorescentes y *scanning* con rayos laser combinados para medidas citométricas en flujo líquido o sobre fase sólida.

Chemunex ScanRDI

El ScanRDI es una de las tecnologías de microbiología rápida más difundidas y aceptadas en un número de aplicaciones farmacéuticas [34]**.** Los ensayos citométricos sobre fase sólida están basados en la detección de células microbianas individuales y viables gracias al uso de colorantes indicativos de viabilidad. El método hace uso de sustratos no-fluorescentes específicos que cuentan con la capacidad de liberar un fluorocromo en el citoplasma de células metabólicamente activas. Sólo este tipo de células, incluyendo esporas, tienen la habilidad de romper el sustrato no-fluorescente y liberar el fluorocromo vía una esterasa intracelular. Aún células que han pasado por situaciones de stress muy agudo, como por ejemplo microorganismos sobreviviendo en medios carentes de sustancias nutritivas como agua para procesos farmacéuticos, conservan esta actividad de esterasa. Aún más, todos los microorganismos que pueden catalogarse dentro del grupo de los viables no cultivables (VNC) van a ser detectados por la técnica de citometría por *laser scanning*. La retención de este sustrato en el interior de las células ocurre sólo en aquellas que conservan su membrana celular en forma íntegra, una prueba más de su viabilidad. El método es tan sensible que es capaz de detectar células individuales [35]. Entre algunas de las desventajas de esta plataforma se pueden mencionar el alto costo de la instrumentación, reactivos y elementos descartables, como así también una relativa intensidad de mano de obra que la hace menos apropiada para aplicaciones con un alto número de muestras (en general, el número máximo de muestras procesadas por operario por día es entre 20 y 30). La identificación de los microorganismos detectados por este método fue hasta hace muy poco tiempo atrás imposible debido a la inactivación celular producida durante la detección. Sin embargo, una modificación al protocolo del procesamiento de las muestras haría posible la identificación de las bacterias detectadas por este sistema (este protocol puede ser obtenido a través del fabricante o distribuidor exclusivo).

Uso en Monitoreo Ambiental: Este sistema es aplicable en todos los casos de análisis microbiológicos basados en una filtración inicial de una muestra líquida. Por lo tanto, monitoreo de agua, y muestras de lavado e hisopados de superficies o de aire con captura de microorganismos en medio líquido son aplicaciones posibles para este método.

(3) Tecnologías Basadas en la Detección de Componentes Celulares Específicos

Monitoreo Rápido de Muestra de Aire

Como mencionamos anteriormente, el monitoreo ambiental es uno de los requerimientos básicos más importantes de la manufactura farmacéutica. Dentro de los requerimientos de control, la detección de partículas viables e inertes es de particular importancia. Los métodos microbiológicos para muestras de aire disponibles hasta no hace mucho tiempo atrás se basaban en la tecnología de cultivo tradicional. Esto implicaba que los resultados no eran inmediatos. Para el momento en que los resultados se hacían disponibles, las condiciones del sitio afectado ya habían sido tratadas y no quedaba ninguna traza de la contaminación original para poder hacer una investigación adecuada y arribar a conclusiones y medidas correctivas. En los últimos años la situación ha cambiado considerablemente gracias al desarrollo comercial de dos tecnologías muy similares que detectan partículas viables en forma continua e inmediata en tiempo real. Como se discutirá en la próxima sección, estos instrumentos no sólo son mucho más veloces que las técnicas convencionales, sino que brindan una nueva dimensión en el conocimiento y condición de control de un área de manufactura y las causas que pueden comprometer ese medio ambiente y desviarlo de los niveles aceptables.

Biovigilant y BioLaz

Como indicáramos previamente, estos sistemas se basan en tecnologías utilizadas para el monitoreo microbiológico de muestras de aire. Ambos instrumentos detectan la presencia de microorganismos en tiempo real y continuo. El flujo aire ingresa en forma continua en el instrumento y es dirigido hacia una cámara de detección donde las partículas en el aire son interceptadas por un rayo láser de 405 nm. La manera en que la luz del rayo láser se dispersa es medida por un detector de dispersión ("*scattering*") que provee un valor estimado del tamaño de las partículas en el aire. Al mismo tiempo el rayo láser produce una auto fluorescencia natural en ciertos metabolitos que se encuentran sólo en el interior de células biológicamente activas. Estas moléculas son la riboflavina, NADH y NADPH, y ácido dipicolínico (presente en esporas). Los resultados son presentados en gráficos que representan el número de partículas biológicas detectadas a través del tiempo en intervalos de 10-20 segundos. Algo importante de destacar es que estos sistemas detectan en general muchas más partículas biológicamente activas que las unidades formadoras de colonias contadas sobre placas de agar. La diferencia es probablemente debida a la gran cantidad de células microbianas que forman parte del grupo de microorganismos viables no cultivables. Este grupo VNC comprende una flora muy diversa de células estresadas por condiciones de calor o frío, medios faltos de nutrientes, o exceso de ellos, niveles inadecuados de oxígeno, tratamientos con desinfectantes, deshidratación, envejecimiento, como así también numerosas especies microbianas que no crecen en los medios convencionales y en las condiciones de cultivo recomendadas por las farmacopeas. Debido a esta disparidad en el número detectado por estas tecnologías y las tradicionales, aún no se han implementado estas técnicas rápidas en reemplazo completo de las tradicionales. Su uso, en forma cautelosa, se está expandiendo como una tecnología suplementaria que indica la aparición de un problema mucho antes que las técnicas tradicionales, y posibilita una toma de acciones correctivas en forma casi inmediata. Otra de las aplicaciones muy útiles de estos instrumentos es el diseño de nuevos procesos de manufactura, la caracterización de puntos de contaminación más frecuentes, investigaciones, determinación de riesgos, y en el entrenamiento de personal. Para esto, una de las tecnologías (Biovigilant) cuenta con una cámara que graba lo que está ocurriendo en el local de manufactura y permite correlacionar un pico de actividad de partículas biológicas con una intervención humana incorrecta o cualquier otro factor que puede estar perjudicando la calidad del aire [36-37]. Entre las desventajas de esta tecnología es la imposibilidad de recuperar e identificar los microorganismos que son detectados por este instrumento. La inversión de capital es también importante, aunque es bueno destacar que no hay costos asociados con reactivos ni descartables ya que la muestra de aire no requiere ninguna preparación ni manipulación subsiguiente.

Uso en Monitoreo Ambiental: Ideal como tecnología suplementaria a los tradicionales colectores de muestras de aire por impacto o por sedimentación.

Tecnología de Captura de Microorganismos en Medio Líquido: Coriolis

El sistema "*Coriolis®μ cyclonic air sampler*" (Bertin Technologies, France) para la captura de microbios flotando en el aire a través de un medio líquido que ha sido validado de acuerdo a la norma ISO 14698, es una variación más sofisticada de un sistema tradicional de aparatos utilizados para la recuperación de muestras de aire [38]. Una de las características más importantes de este sistema es el uso de un medio líquido estéril en reemplazo de las placas de agar para la captura de los microbios contaminantes en el aire. La recuperación de las células microbianas en un medio líquido posibilita la detección, enumeración e identificación de estos contaminantes por el uso de técnicas rápidas y específicas a nivel molecular [27].

El sistema SAS-PCR (PBI biosciences International) también se basa en la cosecha de microbios aéreos en un líquido de cultivo estéril. Este sistema posibilita la detección e identificación de los microorganismos por el uso de técnicas rápidas a nivel molecular.

Detección de Ácidos Nucleicos

Las técnicas microbiológicas rápidas basadas en la detección de ácidos nucleicos por amplificación han recibido una atención cada más creciente desde el ataque terrorista del 11 de Septiembre de 2001 en New York. Desde ese entonces las nuevas demandas en bio-defensa crearon una oportunidad de mercado para el desarrollo de técnicas rápidas de detección, enumeración e identificación de microorganismos [13]**.** A partir de entonces, estas técnicas ofrecieron la oportunidad de ser empleadas en la industria farmacéutica.

Una de las técnicas con mayores ventajas debido a su reproducibilidad y sensibilidad es la amplificación de ADN bacteriano por la acción de una polimerasa muy resistente a incubaciones a elevada temperatura ("*Polymerase Chain Reaction,* PCR"). Otros métodos similares de amplificación están basados en el uso de RNA como templado, la tipificación de ARNs ribosomales, y el secuenciamiento de las cadenas de ADN [39]. Una tecnología basada en el método de PCR cuantitativo ("qPCR") [40] que presenta una suma de características adecuadas para su uso en el monitoreo microbiológico ambiental se discute a continuación.

GeneDisc (Pall):

Este sistema está basado en detección de ADN microbiano usando la técnica de PCR (qPCR). La técnica del PCR ha sido aplicada a innumerables proyectos de investigación y desarrollo en biología molecular desde su primera descripción en 1983 [41-42]. Este método de amplificación de ADN ha sido también usado extensivamente en el área de microbiología aplicada. Como ejemplo de las primeras aplicaciones de esta tecnología, el uso de PCR para clonar y mapear fragmentos específicos de genoma bacteriano [43] fue aplicado para la construcción por ingeniería genética de una cepa mutante de *Streptomyces avermitilis* capaz de producir antiparasitarios no naturales por el autor y colaboradores [44] y en otras especies [45-46]. En años recientes la cantidad de ensayos e instrumentos basados en el uso de PCR se ha ido incrementando aceleradamente y son actualmente usados en un número variado de industrias tales como bio-defensa, cosméticos, forense, bebidas y alimentos, diagnóstico clínico, y productos farmacéuticos **[47,49]**.

A partir de la descripción original de la técnica de PCR como método para amplificar ADN, numerosas variaciones de este método pueden encontrarse en la literatura. Una de ellas es conocida como PCR cuantitativo (qPCR) [40]. Esta técnica puede ser utilizada para la enumeración de microbios contaminantes en el área microbiológica del control de calidad de medicamentos. El PCR cuantitativo sigue una curva exponencial de crecimiento de los productos genómicos amplificados y puede ser monitoreada en forma continua durante 30-50 ciclos de amplificación, permitiendo calcular la cantidad inicial de ADN específico en la muestra. Debido a que la cantidad de ADN detectado por el PCR cuantitativo es directamente proporcional al número de células microbianas presentes en una muestra particular, se puede construir una curva de correlación entre el número de moléculas de ADN y el número de células, permitiendo presentar un resultado estimado en número de microorganismos por unidad de masa o volumen de la muestra farmacéutica original. A menos que el tipo de microorganismo presente en la muestra sea conocido y una curva de correlación es construida durante la validación del método, el resultado es un estimado debido a que la cantidad de ADN (o de copias genómicas) por célula difiere en los diferentes géneros y aún dentro de los microorganismos pertenecientes a una misma especie dependiendo del estado metabólico de las células al momento del análisis.

Una Metodología de Microbiología Rápida para el Monitoreo Ambiental Basada en el qPCR: Recientemente, ha aparecido en el mercado comercial una tecnología basada en el PCR cuantitativo (Pall's GeneDisc® Rapid Microbiology System) que presenta características muy apropiadas para aplicaciones en el área de la microbiología de control de calidad, ver Tabla 6.

Tabla 6. *Características técnicas más importantes del Sistema GeneDisc*

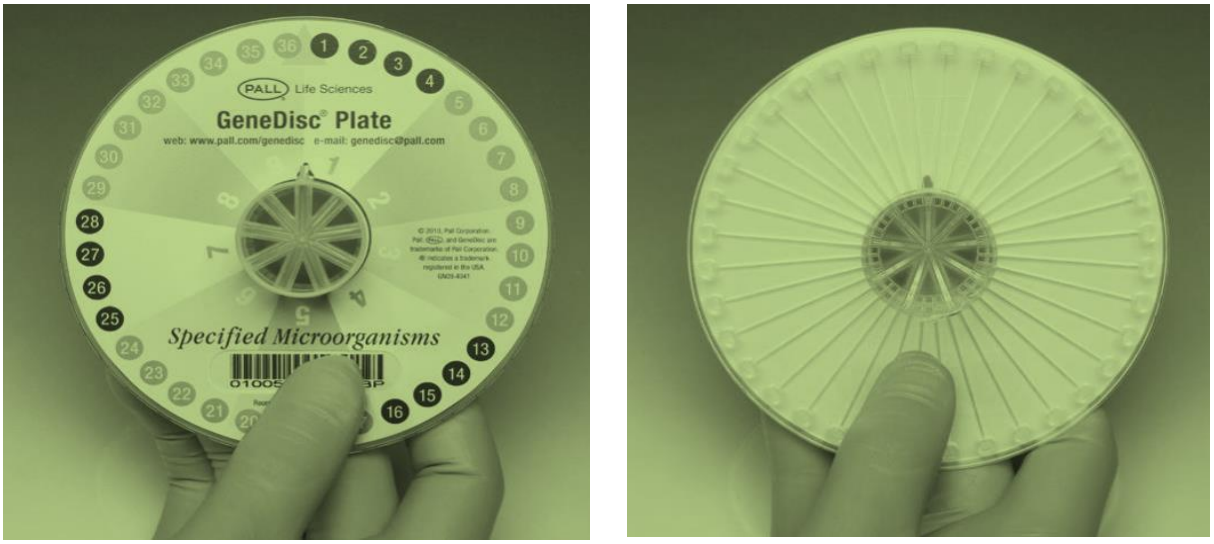
- Tecnología basada en una técnica conocida, robusta y altamente desarrollada como el PCR.
- El uso de curvas estándar usando soluciones estándar de ADN microbiano altamente purificado durante operaciones rutinarias asegura un control inmediato del funcionamiento correcto del equipo y los reactivos.
- Linearidad de respuesta sobre un margen muy amplio de concentraciones de ADN.
- El diseño novedoso de los bloques termales y del sistema de detección óptica aseguran una operación altamente consistente y reproducible.
- El sistema electrónico es muy fácil de usar y brinda los resultados en forma cualitativa (Presencia o Ausencia) o cuantitativa (número de copias genómicas o de células) de acuerdo a la aplicación o ensayo.
- Transferencia de datos a otros sistemas electrónicos es muy simple y rápida.
- Cada ensayo tiene ya incorporado reactivos para controles negativos y positivos.
- Los discos permiten la detección, enumeración e identificación de microorganismos en menos de 3 horas dependiendo de la aplicación.
- Todos los reactivos y elementos de consumo, como así también los parámetros de cada ensayo vienen codificados en código de barras.
- Los reactivos más importantes para el PCR están dispensados en el disco sellado y listo para el ensayo disminuyendo altamente la posibilidad de errores de manipulación.

Este sistema es relativamente simple y de fácil uso e implementación. Es muy interesante destacar que, a diferencia de otros sistemas similares, el uso de esta instrumentación no requiere experiencia previa en biología molecular. Lo último es una característica muy importante para la implementación en la industria farmacéutica donde tecnologías complicadas y entrenamiento de personal prolongado y específico se han sumado como impedimento en la propagación de estas técnicas en forma más generalizada [39]. Como este instrumento hace uso de reactivos ya premezclados y el sistema electrónico viene ya calibrado para la aplicación específica en microbiología de control de calidad, el uso en operaciones de rutina se ve altamente facilitado.

Una metodología muy simple basada en el PCR: El primer paso del método GeneDisc consiste en la filtración de la muestra farmacéutica a través de una membrana filtrante, seguido por la extracción del ADN usando un sonicador y un baño de agua caliente para liberar los ácidos nucleicos.

Una vez obtenida la muestra de ADN, una alícuota de éste es transferida a la placa de GeneDisc (Figura 2). Esta placa se asemeja a un disco de DVD, pero en realidad tiene incorporada un sistema microscópico de distribución de fluidos que brinda las muestras sembradas en la parte central del disco a las cavidades periféricas donde se desarrolla la reacción de PCR. Dos de los reactivos esenciales para el ensayo (*primers* y sondas) ya están pre-empaquetados en el disco y listos para su uso. La parte superior del disco tiene una cavidad central subdividida en 9 sectores independientes. La parte inferior contiene 36 cavidades de ensayo conectadas en grupos de a cuatro a los 9 sectores centrales a través de microcanales. Las muestras de ADN sembradas en los sectores centrales son uniformemente distribuidas a las cavidades periféricas por un sistema incorporado de vacío. Existen discos de 6, 9, y 12 sectores dependiendo el número de muestras que se desea analizar. Cada grupo de cavidades de ensayo periférico cuenta con controles positivos y negativos ya incorporados.

Figura 2. *GeneDisc para la detección de 6 microorganismos específicos (de acuerdo al ensayo descripto en el capítulo 62 de la USP). La parte superior del disco muestra la cavidad central dividida en 9 sectores para sembrar las muestras (izquierda). La parte inferior del disco muestra el sistema de capilares que distribuye las muestras en las cavidades de ensayo ubicadas en la periferia del disco (derecha).*



(Con permiso de Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)

El tercer y último paso es colocar el disco dentro del aparato de PCR (Figura 3). El instrumento puede analizar 1 hasta un máximo de 8 discos simultáneamente. El diseño modular permite flexibilidad en el número de muestras a analizar. Como se dijese anteriormente los resultados se obtienen en menos de 3 horas contando desde el momento en que las muestras son filtradas inicialmente.

El sistema que se muestra en la Figura 2 (máxima configuración) puede procesar un máximo de 96 muestras simultáneamente. La primera aplicación en el mercado para la industria farmacéutica es para el ensayo de microorganismos específicos. Otras aplicaciones más generales, incluyendo la detección universal de bacterias, levaduras y hongos están en desarrollo.

Figure 3. *Instrumento para PCR cuantitativo GeneDisc mostrando la unidad central con monitor y 7 módulos de PCR adicionales. (Con permiso de Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)*

Validación Inicial del Sistema GeneDisc como Instrumento de Control de Calidad Microbiológica en la Industria Farmacéutica

El objetivo más importante en la validación de un método microbiológico alternativo con el propósito de ser usado en ensayos de productos ambientes farmacéuticos es la demostración de equivalencia o superioridad con el método tradicional correspondiente. El proceso de validación debe identificar los riesgos, si los hay, de utilizar el nuevo ensayo como reemplazo del método descripto en la farmacopea, como así también evaluar y definir los parámetros tradicionales y operativos del nuevo sistema. Una guía de la validación de métodos microbiológicos rápidos se puede encontrar en las farmacopeas [50-51] como así también en documentos publicados por asociaciones profesionales [52].

El autor y colaboradores evaluaron el sistema GeneDisc por un período de más de 12 meses siguiendo las directivas descriptas en el trabajo técnico número 33 de la asociación parenteral americana [52]. Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios y confirmaron que esta tecnología es simple de operar, robusta y altamente confiable [53]. La evaluación fue hecha usando los discos diseñados para los ensayos descriptos en el capítulo 62 de la farmacopea norteamericana [1] que permiten determinar la ausencia u ocurrencia limitada de microorganismos específicos que pueden ser detectados en una muestra farmacéutica bajo condiciones de ensayo adecuadas. Estos discos pueden ser utilizados adicionalmente para los ensayos descriptos en otras secciones de las guías regulatorias, tales como los descriptos en los capítulos 51, 2.6.12, y 35.2 de las farmacopeas americana, europea y japonesa, respectivamente, como así también en el ensayo de eficacia de desinfectantes descripto en el documento europeo EN 1040 [1-3, 54].

La Tabla 7 detalla las ventajas más destacables del sistema GeneDisc para su aplicación microbiológica en el control de calidad de productos farmacéuticos en la industria farmacéutica.

Tabla 7. *Ventajas del Sistema GeneDisc*

- Detección rápida de contaminación microbiana
- Intervención humana minimizada
- Procesamiento de 9 muestras por disco en menos de 1 hora. El tiempo total desde la filtración de la muestra a la obtención de los resultados en menor a 3 horas.
- Rapidez en los resultados posibilitan la toma de decisiones y la ejecución de medidas correctivas en forma eficiente
- Obtención simultánea de datos de 6 especies microbianas por muestra
- Entrenamiento mínimo y eficiente del personal de laboratorio
- Validación comparativamente simple de los parámetros instrumentales
- Operatividad satisfactoria demostrado en otras industrias (alimentación, cosméticos, medio ambiente, etc.)
- Acortamiento en la liberación de productos al mercado, disminución de riesgo y mejor control de calidad

A medida que más y mejores tecnologías de microbiología rápida son presentadas al mercado, el uso de estos sistemas en monitoreo ambiental va a ir creciendo y la aprobación por parte de las autoridades regulatorias va a ser más fácil de obtener. Muchas de las tecnologías que inicialmente fueran desarrolladas para el análisis de muestras farmacéuticas, pueden ser adaptadas para el uso en el monitoreo ambiental (Tabla 8).

Tabla 8

Compañía	Instrumento	Aplicaciones
Bertin	Coriolis	Recuperación de microorganismos flotando en el aire en un medio líquido
Bioscience International	SAS-PCR	Recuperación de microorganismos flotando en el aire en un medio líquido
BioMerieux	BacT/ALERT	Detección de CO2 producido por microorganismos presentes en productos o en muestras ambientales
BioVigilant	IMD-A 200-1, IMD-A 220-4	Tecnología óptica para la detección de partículas y microorganismos en muestras de aire
Celsis	RapiScreen, AKuScreen	Detección de ATP por bioluminiscencia en productos
Chemunex	Chem Scan RDI	Citometría en fase sólida para el ensayo de muestras filtrables
Lonza	microCompass	Ensayo por transcripción reversa y PCR para muestras filtrables
Millipore	Milliflex Quantum	Ensayo basado en el uso de reactivos fluorescentes para muestras filtrables
Pall	Pallchek	Detección de ATP por bioluminiscencia en productos, excipientes, agua y medio ambiente
Pall	GeneDisc	Qpcr
Particle Measuring Systems	BioLaz	Tecnología óptica para la detección de microorganismos en muestras de aire
Rapid Micro Biosystems	Growth Direct System	Sistema automatizado de lectura temprana del número de unidades formadoras de placas para muestras filtrables.

Conclusiones

Como se discutiera en las secciones precedentes, existe una gama variada de tecnologías microbiológicas rápidas, y una gran mayoría de estos sistemas pueden ser empleados en el monitoreo microbiológico ambiental. La implementación de estas tecnologías presenta la posibilidad de obtener resultados en forma instantánea o en pocas horas en vez de días requeridos por las técnicas tradicionales. La obtención de resultados en forma rápida brindará un control más efectivo del área de producción.

A medida que estas tecnologías se vayan adoptando, será necesario llevar a cabo un análisis profundo de las ventajas y desventajas que presenta cada una de ellas. Una ventaja obvia es la rapidez observada en la obtención de resultados y el incremento en el control de calidad y la seguridad de los productos manufacturados. Una desventaja muy importante es el costo asociado a la adquisición y uso (descartables, reactivos, mantenimiento, etc.) de estos sistemas. Si bien estas desventajas y ventajas deben ser evaluadas, las tecnologías microbiológicas rápidas siguen progresando y su uso se expandirá sin duda alguna en el futuro cercano.

Referencias

1. United States Pharmacopoeial (USP) 34-NF 29 (2011) United States Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville, MD.
2. European Pharmacopeia (2010) 7th edition. Council of Europe: Strasbourg, France.
3. The Japanese Pharmacopoeia (2006) 15th edition, the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.
4. Working document QAS/09.297/Rev.2 WHO Good Practices for Pharmaceutical Microbiology Laboratories World Health Organization 2010.
5. Farmacopea Argentina. Séptima Edición. 2002. Capítulo 1020 "*Buenas prácticas de fabricación y control*".
6. ANEXO I. *Guía para inspectores: Buenas prácticas de fabricación de medicamentos*. Disposición 2372/2008 – Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. ANMAT. Abril 2008. Salud Pública.
7. ANEXO II. *Clasificación de deficiencias de cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación de medicamentos*. Disposición 2372/2008 - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. ANMAT. Abril 2008. Salud Pública.
8. Salamán-Byron, A.L. (2006) *Implementation of Microbial Environmental Monitoring Program for Non-Aseptic Pharmaceutical Processes.* American Pharmaceutical Rev. Jul/Aug 2006 issue, Volume 9, Issue 5, p. 10-15
9. Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norteamérica Titulo 21 Parte 211 (CFR 21 Part 211) Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals.
10. Parenteral Drug Association (PDA) Journal of Parenteral Science and Technology; Technical Report No. 13, Volume 44 #S1 (1990); *Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program*
11. Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report No. 13 (Revised) *Fundamentals of an Environmental Monitoring Program* (2001). PDA J of Pharm Sci Technol. 55 Supplement TR#1 (5).
12. PhRMA Environmental Monitoring Work Group (1997) "*Microbiological Monitoring of Environmental Conditions for Nonsterile Pharmaceutical Manufacturing*", Pharm. Technol., March, pp. 58-74.
13. Denoya, C.D., S.T. Colgan, and G.C. du Moulin. 2006 "*Alternative Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry: The Need for a New Microbiology Curriculum*". American Pharmaceutical Review 9(6):10-18.
14. Korcznski, M.S. 2005. *The Importance of Emerging rapid Methods technology to Regulators and Industry* (Chapter 3). *In* Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, ed. Miller M., pp273-290. Parenteral Drug Association, Bethesda, MD.
15. Moldenhauer, J. 2005. *Introduction to Rapid Microbial Methods for Environmental Monitoring in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA
16. Denoya, Claudio D. (2010). "*Alternative Microbiological Methods and New Pharmaceutical Microbiology Curriculum*". *In* Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices (M. R. Saghee, T. Sandle and E. C. Tidswell, eds.), First Edition, Business Horizons Pharmaceutical Publishers, New Delhi, India. Chapt. 20, pp. 491-518.
17. Ceresa, L. (2005) "*Pall System" in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook* (J. Moldenhaeur, Ed), Volume II ISBN Number: 1-930114-88-5 Parenteral Drug Association Books, Bethesda
18. Denoya, C.D., J. Reyes, E. Dawson, D. Sessoms, M. Baumstein, and J. Shabushnig. (2010) "*A Rapid Microbiological Assay to Monitor the Effectiveness of a Vaccine Injector Sanitization Following a Microbial Challenge Procedure*" American Pharmaceutical Review, 13(4) May/Jun, pages 54-61
19. Stanley, P.E. (1989) *A concise beginner's guide to rapid microbiology using adenosine triphosphate (ATP) and luminescence. In ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology*, P. E. Stanley, B. J. McCarthy, and R. Smither, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1-11.

20. Kramer, M., Suklje-Debeljak, H., and Kmetec, V. (2008) *Preservative Efficacy Screening of Pharmaceutical Formulations using ATP Bioluminescence*. Drug Dev and Industrial Pharmacy, 34: 547-557.

21. Nielsen, P. and Van Dellen E. R*apid Bacteriological screening of cosmetic raw materials by using bioluminescence* (1989) Journal of the Association of Analytic Chemists, 72(5) 708-711.

22. Lehninger, *Principles of Biochemistry* (2008). Fifth edition Eds. David L. Nelson, Michael. M. Cox, WH Freeman publishers. New York, NY.

23. Chappelle E.W and Levin, G.V. (1968) *Use of the Firefly Bioluminescence Reaction for Rapid Detection of Counting Bacteria*. Biochemical Medicine, 2: 41-52.

24. White, E.W., McCapara, F., Field, G.F, and McElroy W.D. (1961). *The Structure and Synthesis of Firefly Luciferin*. Journal of American Chemical Society, 83: 2402- 2403.

25. Denoya, C.D. (2009) "*Technical Assessment of a Bioluminescence-based Rapid Microbiological Method (RMM) for the Detection of Microbial Contaminants in Pharmaceutical Samples"* Podium presentation. European Meeting of the Parenteral Drug Association, Berlin, Germany, Febrero 2-5, 2009.

26. *Testing Procedures and Applications for the Pallchek Rapid Microbiology System*", USTR 2358, Pall Life Sciences, Port Washington, New York.

27. Chen, L; W. Snapp, S. Fennell, M. Boquet, C. Seeger, J. Reyes, and C. Denoya (2009) "*Evaluation of Rapid Microbiological Methods in Environmental Monitoring: The Use of a Device that Collects Air Samples into Liquid Media"* Poster presentado en el 4th Annual Global Conference on Pharmaceutical Microbiology, Parenteral Drug Association, Bethesda, Maryland, October 5-8, 2009

28. Denoya, C; J. Reyes, M. Ganatra, and D. Eshete. (2011) "*Rapid Sterility Testing Using ATP Bioluminescence-based Pallchek™ Rapid Microbiology System*" in *Rapid Sterility Testing* (J. Moldenhauer, Ed.) Parenteral Drug Association Books, Bethesda, MD Capitulo 17, p. 433-461.

29. BacTAlert website. http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industry-microbiology/home

30. du Moulin, GC, Kielpinski G, Prinzi S, Duguid J, and Price A. 2005. *Detection of microbial contaminants for cell therapy products: Validation of an automated microbial detection system.* In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, ed. Miller M., pp273-290. Parenteral Drug Association, Bethesda, MD.

31. Growth Direct website http://www.rapidmicrobio.com/

32. Strauss, D. 2005. *Rapid Environmental Monitoring Using the Growth Direct Test in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.

33. Deutschmann, Sven (2011) "*Qualification and Validation of an Automated Rapid Growth Based System for In-Process-Control and Water Testing."* Parenteral Drug Association, Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA.

34. Moldenhauer, J. y P. Yvon. 2005. *Environmental Monitoring Using the Scan RDI in Environmental Monitoring A Comprehensive Handbook*, Volume II (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.

35. Smith, R.; M. von Tress; C. Tubb; and E. Vanhaecke. 2010. "*Evaluation of the ScanRDI_ as a Rapid Alternative to the Pharmacopoeial Sterility Test Method: Comparison of the Limits of Detection*" PDA J Pharm Sci and Tech 2010, 64:356-363.

36. M. J. Miller, H. Lindsay, R. Valverde-Ventura, and M. J. O'Conner. *Evaluation of the BioVigilant_ IMD-A™, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles.* Part I. Review of the Technology and Comparative Studies with Conventional Methods PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 63, No. 3, May–June 2009 245-258.

37. Miller M., M. R. Walsh, J. L. Shrake, R. E. Dukes, and D. B. Hill. *Evaluation of the BioVigilant_ IMD-A™, A Novel Optical Spectroscopy Technology for the Continuous and Real-time Environmental Monitoring of Viable and Nonviable Particles.* Part II. Case Studies in Environmental Monitoring during Aseptic Filling, Intervention

Assessments, and Glove Integrity Testing in Manufacturing Isolators PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology Vol. 63, No. 3, May–June 2009 259-283.

38. Gadal, P. and Q. Desjonqueres. 20*09. Active Microbial Air Sampling with Coriolis μ* Air Sampler and ScanRDI *in Environmental Monitoring. A Comprehensive Handbook*, Volume III (Ed. by J. Moldenhauer) Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, USA.
39. Denoya, C. 2009. "*Nucleic Acid Amplification–based Rapid Microbiological Methods: Are these technologies ready for deployment in the pharmaceutical industry*?" American Pharmaceutical Review, 12(4):12-21.
40. Bustin, S.A. "*Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*" (2002) J. Molec. Endocrinology 29:23-39
41. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. "*Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*" (1987) Methods Enzymol. 155:335-50.
42. www.nobelprize.org Este sitio describe el premio Nobel otorgado al descubridor de la técnica de PCR.
43. Skinner, D.D. and C. D. Denoya. (1993). "*A Simple DNA Polymerase Chain Reaction Method to Locate and Define Orientation of Specific Sequence in Cloned Bacterial Genomic Fragment*" Microbios (Cambridge, UK) 75:125-129.
44. Denoya, C. D.; R. W. Fedechko, E. W. Hafner, H. A. I. McArthur, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, K. Stutzman-Engwall, R. G. Wax, and W. C. Wernau. 1995. "*A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (bkdFGH) from Streptomyces avermitilis: Its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a bkdF mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins*" Journal of Bacteriology 177:3504-3511
45. Wang, P., C. D. Denoya, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, K. K. Wallace, R. Digate, S. Patton, N. Banavali, G. Schuler, M. K. Speedie, and K. A. Reynolds. 1996. "*Cloning and characterization of the gene encoding 1-cyclohexenylcarbonyl CoA reductase from Streptomyces collinus*" Journal of Bacteriology 178:6873-6881.
46. Florova, G., C. D. Denoya, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, and K. A. Reynolds. 1998. "*Cloning, Expression, and Characterization of a Type II 3-Dehydroquinate Dehydratase Gene from Streptomyces hygroscopicus*" Archives of Biochemistry and Biophysics 350(2):298-306
47. Jimenez, L.; Smalls, S.; Ignar, R. (2000) *Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples*. J. Microbiol. Methods *41* (3), 259 – 65.
48. Jimenez, L.; Ignar, R.; D'Aiello, R.; Grech, P. (2000) *Use of PCR analysis for sterility testing in pharmaceutical environments.* Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology *8* (1), 11–20.
49. Kawai, M.; Matsutera, E.; Kanda H.; Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. (2002). *16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 68* (2), 699 –704
50. United States Pharmacopeia, Chapter <1223> "*Validation of Alternative Microbiological Methods*". USP 34–NF 29 (2011) United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD.
51. European Pharmacopeia, Chapter 5.1.6 "*Alternative Methods for Control of Microbiological Quality*" (2010) 7th edition. Council of Europe: Strasbourg, France.
52. Parenteral Drug Association (PDA). "*Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods*". PDA J Pharm Sci & Technol 2000; 54(3), suppl. Technical Report 33:2-9.
53. Denoya, C. (2011) "*An innovative qPCR technique applied to Rapid Microbiological testing*". Podium presentation. Annual Meeting of the Parenteral Drug Association, San Antonio, TX, April 11-15, 2011.
54. European Committee for standardization (2005): *European standard EN 1040: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements*.
55. Jeanne Moldenhauer. Establishing Ongoing Monitoring, *Surveillance and Evaluation Programs*. Vectech Pharmaceutical Consultants. Farmington Hills. USA.

Capítulo IV.3.

USP <1116> y las Implicancias de las Tasas de de Recuperación de Contaminación Microbiana

Claudio Denoya

Introducción

Cambios a partir de la USP 35

Recomendaciones para el uso de CRR

Un caso de estudio: Tasas de contaminación en muestras de ropa

Conclusiones sobre el uso de CRR

Bibliografía

Introducción

A partir de la edición Nro. 35 de la United Stated Pharmacopeia (USP), el capítulo <1116> *Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments* [1], incluye definiciones y una guía para el control y monitoreo microbiológico de ambientes para procesos asépticos. Es probable que este capítulo informativo sea uno de los más completos de la USP, y es particularmente un desafío debido a su propuesta sobre la medición de la contaminación microbiana basada en el cálculo de Tasas de Recuperación de la Contaminación (*Contamination Recovery Rates o* CRR), a partir del método convencional de conteo de unidades formadoras de colonias (ufc), Pero en lugar de utilizar los límites microbianos establecidos en las guías [2,3,4], este capítulo de la USP propone valores de CRR expresados como un máximo porcentaje permitido de muestras ambientales con contaminación. Esta propuesta ha generado una amplia gama de discusiones entre los profesionales con respecto a las implicancias potenciales de este cambio.

Es importante aclarar que este capítulo es informativo, y que como tal, provee información y recomendaciones para ambientes donde existe riesgo de contaminación microbiológica controlado por procesos asépticos. Por lo tanto, el capítulo en su formato actual proporciona recomendaciones aún no adoptadas o no ejecutables por muchos laboratorios en Estados Unidos y el mundo. Esta aclaración es importante porque la recomendación sobre la adopción de las CRR está generando un debate positivo que probablemente requerirá mayor discusión y aclaración. Seguramente será necesario llevar a cabo un enfoque armonizado por parte de las autoridades estadounidenses, europeas y japonesas para evitar la disparidad de los valores de los límites microbianos.

Cambios a partir de la USP 35

Los principales cambios que sufrió el capítulo a partir de la edición 35 de la USP, son:

1. **Título:** El cambio más obvio se refiere al título del capítulo. El título anterior del capítulo <1116> era *Microbial Control and Monitoring Environments Used for the Manufacture of Healthcare Products*, mientras que el título revisado es *Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments*.
2. **Alcance:** Este capítulo se aplica a los siguientes productos fabricados en un área aséptica: Productos farmacéuticos estériles, APIs, intermediarios y excipientes estériles, y algunos Dispositivos médicos.

Además los tipos de ambientes que a los que se aplica este capítulo son: Áreas limpias convencionales con flujo de aire unidireccional, máquinas Blow/ fill/ seal, Restricted Access Barrier Systems (RABS) y Aisladores.

3. **Llenado aséptico:** El énfasis en la palabra "aséptico" en la introducción del capítulo significa que éste no es aplicable a todos los productos "estériles", ya que los que son esterilizados terminalmente están fuera de su alcance. Durante un llenado aséptico debe existir un bajo nivel de contaminación, aunque la expectativa de contaminación cero técnicamente no es posible y por lo tanto no es realista. Un nivel bajo de contaminación durante un período determinado de tiempo es aceptado como una norma en las operaciones donde el personal está presente.
4. **Clases de áreas:** En el capítulo <1116> actual todas las clasificaciones antiguas (por ejemplo M3.5) y las antiguas clases de la FDA 209E (por ejemplo Clase 100) fueron eliminadas y reemplazadas por las clases ISO 14644-1 y en estado de operación. (Tablas 1 y 2).

Tabla 1 *Límites microbianos en operación según European Union Guidelines (Annex 1) y FDA Guidance (2004)*

Grade	Air Sample cfu/m3	Settle Plates (Ø 90 mm), cfu/4 hours	Contact Plates (Ø 55 mm), cfu/plate	Glove Print 5 fingers cfu/glove
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	–
D	200	100	50	

Clean Area Classification (0.5 mm particles/ft3)	ISO Designation	> 0.5 µm particles/m³	Microbial Active Air Action Level (cfu/m³)	Microbial Settling Plates Action Level (diam 90mm; cfu/4 h)
100	ISO 5	3,520	1	1
1000	ISO 6	35,200	7	3
10000	ISO 7	352,000	10	5
100000	ISO 8	3,520,000	100	50

Table 2 *<1116> Tasas de recuperación de la contaminación sugeridas para Áreas Asépticas*

Room Classification	Active Air Sample (%)	Settle Plate (9 cm) 4h exposure (%)	Contact Plate or Swab (%)	Glove or Garment (%)
Isolator/Closed RABS (ISO 5 or better)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ISO 5	<1	<1	<1	<1
ISO 6	<3	<3	<3	<3
ISO 7	<5	<5	<5	<5
ISO 8	<10	<10	<10	<10

5. **Evaluación de riesgos:** El capítulo <1116> enfatiza que incluso con un buen programa de monitoreo de partículas totales, no es posible eliminar la contaminación de partículas generada por las operaciones mecánicas, más las partículas totales producidas por el personal. Por lo tanto como rutina se deben implementar, tanto programas de monitoreo de partículas totales, como programas de monitoreo microbiológico. El capítulo también discute las diferencias entre las operaciones en áreas limpias convencionales y RABS abiertos, y ambientes más controlados donde las intervenciones del personal tienen un impacto significativamente menor en la contaminación microbiana, como en RABS cerrados y aisladores. Está claro que el riesgo relativo de la calidad microbiana depende de los diferentes tipos de sistemas de barrera aséptica; cuanto mayor sea la barrera, menor será el riesgo esperado de contaminación.
6. **Renovación del aire:** Como ni en la ISO 16444 [5] ni en la Federal Standard 209E estaban incluidas especificaciones para renovación de aire por hora y para la velocidad; el capítulo <1116> proporciona una orientación: ISO clase 8 (mínimo 20 renovaciones / hora), ISO clase 7 (> 50 renovaciones / hora), e ISO clase 5 (> 100 renovaciones / hora). En aisladores y RABS pueden justificarse renovaciones

menores. Además destaca que estas especificaciones deberían utilizarse sólo como una guía general debido a las numerosas variaciones de diseños y operaciones de las áreas limpias.

7. **El caso CRR:** El capítulo <1116> enfatiza que, habiendo operadores presentes durante la operación, la contaminación es inevitable. Los siguientes puntos son discutidos en la forma convencional de evaluación de la contaminación microbiana:

    a. Monitoreo activo en tiempo real de Particulas totales. Aunque se ejecute continuamente no proporciona información directa sobre la contaminación microbiológica del ambiente.

    b. Se enumeran los microorganismos transportados por el aire como cfu, pero la gran diversidad de estados físicos (células individuales o agrupadas, asociadas a partículas inertes, etc.) hacen que los recuentos estén sujetos a una importante variabilidad.

    c. Una muestra de monitoreo microbiano representa solo los microorganismos capturados durante un período de tiempo estrecho y en un lugar particular.

    d. La ausencia de crecimiento en una muestra microbiológica no significa que el ambiente está libre de contaminación.

    e. Las diferencias numéricas entre los niveles de Alerta y de Acción son bastante pequeños en áreas ISO 5 y en otras áreas. Esas diferencias no son significativas considerando la gran variabilidad de la recuperación del ensayo microbiológico ($\pm$ 0.5 $\log_{10}$) [1].

    En base a algunos de los puntos anteriormente citados, el capítulo <1116> propone una nueva perspectiva en el control del medio ambiente basándose en las tasas de incidentes en lugar de niveles de acción y alerta. Según esta propuesta, todos los eventos de contaminación (≥1 ufc, incluidos los eventos que exceden y los que no exceden el nivel especificado) serán considerados en el análisis de tendencias. ¿Podría esta tendencia ayudar a mejorar los resultados y ayudar a mantener un estado continuo de control? La respuesta deberá probarse mediante análisis comparativo de un método versus el CRR alternativo.

    La propuesta enfatiza que, en lugar de eventos aislados, el análisis de datos efectuado a tiempo detectaría cambios en la tasa de recuperación de contaminación (CRR) que pueden ser indicativos de cambios en el estado de control en el ambiente. Debido a la variabilidad inherente de los métodos de muestreo microbiano y de los resultados de ufc, <1116> recomienda el uso de CRR como una medición más útil de la tendencia que el número de colonias recuperadas de una muestra determinada (Tablas 1-2). La tasa de incidencia es el porcentaje de muestras ambientales que contienen contaminación microbiana (≥ 1 cfu). Por ejemplo, una tasa de incidencia del 1% significaría que solo el 1% de las muestras tomadas tienen contaminación independientemente del número de colonias. En otras palabras, el 99% de las muestras tomadas están completamente libres de contaminación.

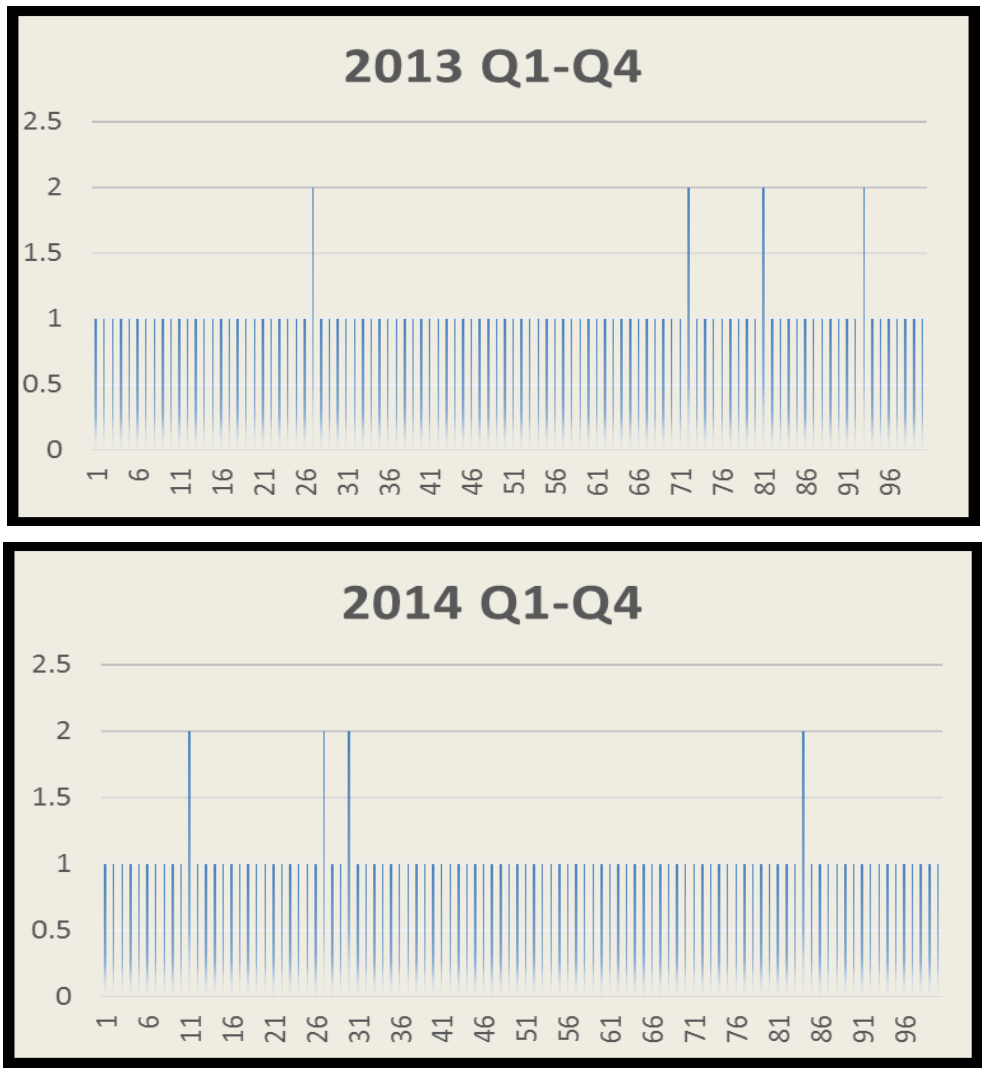
Recomendaciones para el uso de CRR

- Usar la frecuencia de aparición de una contaminación en lugar de números absolutos de ufc detectadas en una muestra.
- Determinar la tasa o porcentaje de recuperación en cada ambiente o punto de muestreo.
- La frecuencia de detección de contaminación debe ser retabulada al menos mensualmente.
- Si se adopta la evaluación por CRR, en un área clase ISO 5 una sola excursión de más de 15 ufc deberá ser investigada, aunque la CRR sea menor al 1%.
- Investigar si el incidente fue aislado o puede relacionarse con otros eventos aún con 1 a 5 ufc que pueden indicar que existe una situación inusual.

Un caso de estudio: Tasas de contaminación en muestras de ropa.

En un importante laboratorio europeo se realizó el control de ropa y se tabuló y evaluó anualmente. Hubo aproximadamente 100 muestras recolectadas por año y evaluadas en trimestres (eje horizontal en las Figuras 1 y 2).

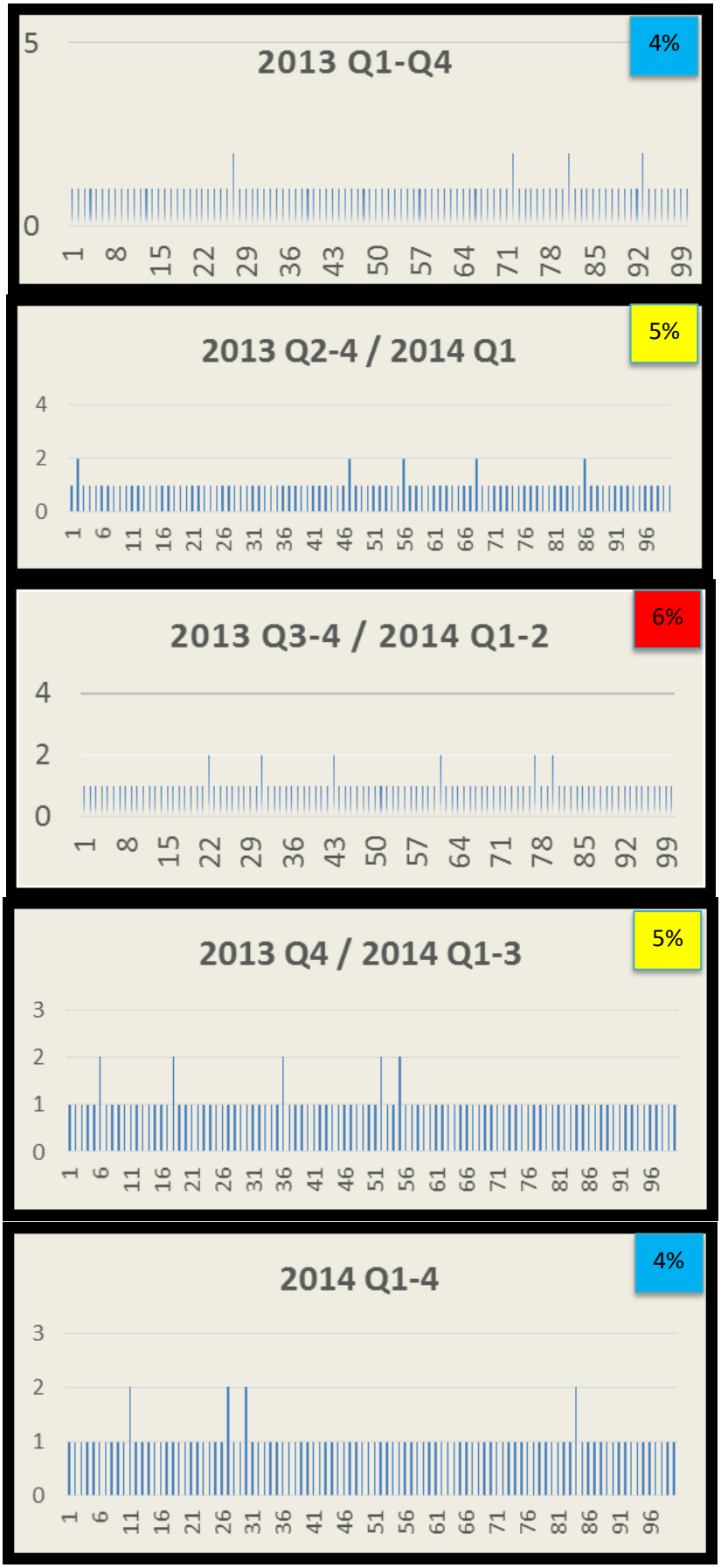
***Figura 1**. Monitoreo microbiológico de ropa. Evaluación anual años 2013 y 2014*



Se muestran dos gráficos de resultados anuales en la Figura 1 (2013 y 2014). En este ejemplo, a las muestras no contaminadas se les asignó un valor de 1, y a las muestras que estaban contaminadas con valores de ufc más bajos que el límite de acción se les asignó un valor de 2 (eje vertical de las Figuras 1 y 2). No se observaron muestras con valores iguales o superiores al nivel de acción. En este estudio, la tasa de muestras contaminadas en 2013 y 2014 fue del 4% en cada año. (Figura 1).

Es importante tener en cuenta que, en términos de límites en la ropa, para las áreas GMP Grado B / ISO clase 7 de la UE, la industria a menudo adopta los mismos límites aplicados a las placas de los dedos de los guantes. Según este criterio común, el nivel de acción para la ropa es normalmente de 5 ufc / 25 cm^2 y el límite se cumplió de acuerdo a los resultados de ufc (todos los positivos fueron <5 ufc / muestra) (como se ve en la Tabla 1 para el límite microbiano según UE). Además, también se cumplió el criterio de aceptación según CRR (Tabla 2). Todos los positivos analizados anualmente presentaron una tasa de incidencia del 4%, que es un valor que cumple con la recomendación <1116> de menos del límite de 5% (Tabla 2) para el área ISO 7.

Figura 2: *Evaluación de la CRR cada 3 meses*



Si el CRR anual se actualiza trimestralmente (ver Figura 2), en el tercer análisis de tendencias actualizado se demostró incumplimiento de las recomendaciones de <1116>. Según la Figura 2, la CRR es del 5% cuando se agregaron los resultados del primer trimestre de 2014, es 6% para la tendencia que termina en Q2 de ese año, y se vuelve a observar una CRR del 5% para la tendencia que finaliza en Q3.

En este caso los análisis trimestralmente de los CRR implicaron una anticipación de un problema y una observación más continua de los datos de tendencias, y demostró ser útil para identificar la pérdida de control de una manera más sensible que siguiendo un enfoque convencional del análisis de los datos.

Conclusiones sobre el uso de CRR

• Orientación actual sobre límites microbianos: aún en muchos laboratorios para ambientes de procesamiento aséptico, la evaluación se basa en el conteo de cfu.

• El capítulo <1116> propone una nueva forma de ver los datos microbiológicos por adopción de CRR como valor porcentual máximo permitido de muestras contaminadas (con un número de cfu igual o mayor a uno).

• El estudio de caso ilustra que depende de cómo se ven los datos (ya sea a través límites basados en ufc, o a través de la propuesta basada en CRR) un ambiente que puede cumplir en el primer caso, podría ser no cumplir bajo los nuevos criterios.

• A niveles de recuperación muy bajos no hay forma de establecer niveles de alerta o acción estadísticamente significativos. El énfasis debe darse a los incidentes, incluso en aquellos que demuestran tener solo 1 ufc.

• El método de Tasas de incidentes expresado en valores porcentuales obligan a mirar históricamente los resultados de al menos 100 muestras hacia atrás, en lugar de enfocar en ese solo incidente actual, o solo en muestras que muestren contaminación encima de los niveles de acción.

• También el método ayuda a poner el foco en todas las muestras que tienen alguna contaminación, independientemente del número. Esto puede ser una indicación de la pérdida de control.

• Aun habiendo adoptado el método de CRR como un modo de analizar la contaminación microbiana, el capítulo <1116> enfatiza que para áreas ISO 5, toda excursión de más de 15 ufc debe ser investigada.

Agradecimiento

Se agradece a la Dra. Mónica Lagomarsino por su excelente traducción de este capítulo al idioma español.

Bibliografía

1. USP, “USP <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments,” USP 35 vol. 1 2012a, 2012: pp. 697-707.
2. Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing - Current Good Manufacturing Practice, U.S. Food and Drug Administration, 2004.
3. “Manufacture of Sterile Medicinal Products” In EudraLex – The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice – Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products, European Commission, 2008
4. Dalmaso, G., and Denoya, C. “Microbial Control and Monitoring in Aseptic Processing Cleanrooms” *Controlled Environments* (2015) http://www.cemag. us/articles/2015/01/microbial-control-and-monitoring-aseptic-processing-cleanrooms
5. ISO International Standard 14644 Part 1, International Organization for Standardization, May 1999.

Bibliografía adicional recomendada:

1. Claudio Denoya, Ph.D., and Gilberto Dalmaso, Ph.D. (2016) “Microbial Monitoring in Cleanrooms: Use of Contamination Recovery Rates (USP<1116>), Real Time Monitoring, and the State of Contamination Control” i*n*: "Contamination Control in Healthcare Product Manufacturing", (Russell Madsen and Jeanne Moldenhauer, Editors), Parenteral Drug Association, Bethesda, MD, and Davis Healthcare International Publishing, River Grove, IL, USA.
2. Denoya, Claudio, and Dalmaso, Gilberto. (2015) "USP <1116> and its implications for Measuring Microbial Recovery Rates" PDA Letter 51:26-29.
3. Stauffer, Rebecca (2018) "Seeing The Hidden: How Contamination Recovery Rates Offered a Better Look at the True State of Microbial Control" PDA Letter (March), pages 20-22.
4. Using contamination recovery rates to evaluate an environmental monitoring trending program changed the way. Paula Peacos**,** Associate Director, Global Microbiological Compliance, Bristol- Myers Squibb, viewed the movement of microbial contamination within a facility, according to her presentation, “Using Contamination Recovery Rates [CRR] for Environmental Monitoring Trending,” Oct. 16, 2017 at the *12th Annual PDA Global Conference on Pharmaceutical Microbiology)*.

Capítulo IV.4.

Simulación del proceso de llenado aséptico o Media fill

Néstor Oscar Aversa

Introducción

Objetivo

Aseguramiento de la esterilidad

Ensayo de Media fill

- *Guía de fabricación*
- *Condiciones del proceso*
- *Frecuencia y cantidad de ensayos*
- *Tamaño de lote de cada ensayo*
- *Medios de cultivo*
- *Condiciones de incubación*
- *Inspección de las unidades*
- *Interpretación de los resultados*
- *Informe final*

Conclusiones

Bibliografía

Abreviaturas

Introducción:

El concepto de esterilidad de productos farmacéuticos, desde ya hace muchos años ha sido considerado como "*Ausencia total de microorganismos vivos*".

Existen dos grandes grupos de productos estériles:

a) Aquellos que luego de llenados y cerrados reciben un tratamiento esterilizante: *Esterilización terminal.*

b) Aquellos que por distintos motivos sólo pueden esterilizarse por filtración o bien se elaboran a través de un mezclado entre componentes estériles. A este proceso se lo denomina *Procesamiento aséptico.*

Para aquellos productos con esterilización terminal existe un razonable acuerdo internacional sobre cuáles deben ser las condiciones del proceso de esterilización, que conduzcan con un razonable margen de seguridad a obtener un producto estéril. A consecuencia de ello es factible realizar una validación del proceso de fabricación, llenado, cierre y esterilización que conduzca a resultados predecibles, reproducibles y **registrables lote a lote**.

En particular, para aquellos procesos con esterilización terminal por calor húmedo (autoclave) se ha desarrollado el concepto de liberación paramétrica [1, 2]. A través de la misma, existe la posibilidad de liberar el producto sin necesidad de realizar el ensayo de esterilidad.

Recientemente se ha introducido el concepto de desarrollar productos teniendo en cuenta la resistencia térmica de la carga biológica del producto antes de ser esterilizado terminalmente y diseñar ciclos con menor tiempo de esterilización teniendo en cuenta el valor D de dicha carga biológica.

La evolución tecnológica existente para productos con esterilización terminal no está acompañada por una situación similar para productos procesados asépticamente. En este caso, la forma de demostrar la esterilidad de cada lote producido ha sido y sigue siendo motivo de controversia y de revisión permanente. Se trata de un proceso **altamente dependiente del comportamiento humano,** de difícil documentación lote a lote, salvo evidencias indirectas, y si su proceso de validación ha sido satisfactorio **sólo indica que lo fue ese día.** Por ello, hay que tener en cuenta que la validación del *media fill* (que constituye la calificación de *performance* del procesamiento aséptico) puede ser prospectiva y/o concurrente pero nunca retrospectiva.

Los diseños de dichos procesos deben considerar que la intervención humana sea cada vez menor. Ya hay experiencias concretas y documentos para justificar el uso de aisladores (*isolators* en inglés) como un mecanismo para minimizar la posibilidad de contaminación debido a la intervención humana [3,4,5,6]. Ver capítulo de *Filtros HEPA, Flujo laminar y cabinas de bioseguridad*, en este manual.

Objetivo:

El objetivo de este capítulo es revisar la evolución de los conceptos teóricos y prácticos tendientes a asegurar la esterilidad de productos procesados asépticamente. Se detallará en particular el proceso de simulación de llenado con medio de cultivo también conocido por su término en inglés: *media fill*. Previamente, y dada su importancia en la interpretación de los resultados del *media fill*, se desarrollará el concepto de aseguramiento de la esterilidad del punto de vista práctico (estadístico).

Aseguramiento de la esterilidad:

Más allá de la definición teórica de esterilidad, en la práctica ha sido manejada en términos probabilísticos tanto para procesos de esterilización terminal como de procesamiento aséptico. Analíticamente es imposible demostrar la esterilidad en forma absoluta debido limitaciones de método como tamaño de muestra, medios de cultivo, condiciones de incubación, variedad de microorganismos.

A los procesos por esterilización con vapor húmedo (autoclave) se le exige una fracción de contaminación de no más de 1 (una) unidad contaminada en 1.000.000 (un millón) de unidades esterilizadas,

$$P_1 = 1 \times 10^{-6}$$

donde $\mathbf{P_1}$ es la tasa máxima de contaminación permitida.

En inglés esta tasa se la conoce como **S.A.L.** (*Sterility Assurance Level*).

Para procesos asépticos, históricamente se ha considerado un SAL mínimo en el que $\mathbf{P_1 = 1 \times 10^{-3}}$, aunque como se verá más adelante las referencias más actualizadas al respecto han abandonado este criterio.

La importancia de estos conceptos, además de propender a la posibilidad de validar los procesos de esterilización, está potenciada por dos razones fundamentales:

1) La criticidad de la mayoría de los pacientes que requieren de productos estériles para mitigar o mejorar sus problemas de salud.

2) **La enorme limitación estadística del ensayo de esterilidad,** porque se trata de un ensayo destructivo, es decir que **nunca puede ser repetido sobre la misma muestra** y la cantidad de unidades empleadas para el ensayo es prácticamente constante y generalmente independiente del tamaño del lote, **o sea que no existe muestreo estadístico**. En síntesis, la evidencia científica es insuficiente para asegurar la esterilidad de un lote en base a un ensayo de laboratorio. La aprobación del producto, por lo tanto, no puede estar basada sólo en dicho ensayo. No permite además evaluar la influencia de la introducción de cambios en el proceso.

   La probabilidad de detectar una contaminación en un ensayo de esterilidad corresponde al modelo de probabilidad redundante [7], basado en que si 1 (una) sola de las unidades de la muestra de tamaño **n** está

contaminada, es suficiente para que el ensayo de esterilidad falle, o sea que resulte positivo, acorde a la siguiente fórmula:

$$P = 1 - (1 - SAL)^n$$

donde:

P = Probabilidad de detectar una unidad contaminada (nivel de confianza alcanzado).
SAL = Fracción contaminada del lote. Su valor oscila entre 0 (estéril) y 0 < **SAL** ≤ 1 (contaminado).
n = Cantidad de unidades tomadas para el ensayo.

En la Tabla 1 se aprecia la limitación mencionada.

***Tabla 1**: Relación entre el SAL, el tamaño de la muestra y la probabilidad de detectar una unidad contaminada.*

SAL	n	P
0.001	20	1.98%
0.001	40	3.92%
0.001	3000	95.03%
0.14	20	95.10%
0.000001	20	0.002%
0.000001	3000000	95.02%

Si el producto estuviese contaminado a una tasa del 0.1% (criterio obsoleto de aprobación del *media fill*) con las 20 unidades por medio de cultivo generalmente empleadas para el ensayo de esterilidad sólo habría una probabilidad cercana al 2% de detectar la contaminación. Aún con el doble de muestra (criterio obsoleto de repetición del ensayo de esterilidad) la probabilidad sería aún bajísima, alrededor del 4%. Sólo analizando 3000 unidades (criterio de cantidad obsoleto de unidades mínimas a ser llenadas durante el *media fill*) y con la misma tasa de contaminación, la probabilidad de detectar la contaminación alcanza valores estadísticamente aceptables (95,03%). El lote debería estar al menos contaminado un 14% para ser detectado por el ensayo habitual de esterilidad con el mismo nivel de confianza estadística (95.10%).

Por otra parte, para productos con esterilización terminal por calor húmedo (SAL=0.000001) la probabilidad de detectar una unidad contaminada sería de 0.002% con el ensayo de esterilidad habitual de 20 unidades, y la cantidad de unidades que habría que analizar para detectar al menos una unidad contaminada con el mismo nivel de confianza estadístico (95.02%) es ridícula desde todo punto de vista y supera el tamaño de lote de cualquier producción farmacéutica (tres millones de unidades en un lote).

No obstante, sigue siendo el ensayo oficial de las farmacopeas el que debe ser realizado para demostrar la esterilidad a través de un ensayo de laboratorio, aunque indicando que no puede ser el único factor de evaluación[8].

Ensayo de Media Fill:

Son varios los factores a tener en cuenta para su correcta realización e interpretación:

Guía de fabricación:

Debe prepararse un documento que describa todos los pasos desde la preparación del medio de cultivo hasta la interpretación final de los datos y sus conclusiones. Este documento debe tener la misma cadena de firmas que una guía de fabricación de productos.

Todos los reactores, recipientes de transferencia, filtros y otros accesorios **deben ser exactamente los mismos que los empleados en la producción rutinaria del producto, y lavados y esterilizados según los procedimientos estándar normalizados empleados en los procesos productivos habituales.**

Es mandatorio que el medio de cultivo colocado en el primer reactor sea estéril si el proceso no conlleva ningún tipo de filtración (caso suspensiones, por ejemplo), o bien con bajo *bioburden* (carga microbiana) para procesos con filtración esterilizante. Actualmente se dispone de medios comerciales en polvo ya esterilizados por radiación gamma que pueden ser útiles no sólo para la validación de procesos asépticos de productos líquidos sino también de polvos. Para procesos de filtración, la muestra para determinar el *bioburden* debe tomarse antes del último paso de filtración a menos que el segundo filtro sea redundante donde en ese caso se debe tomar la muestra antes de la primera filtración [(11)]. O bien antes de la segunda filtración si la toma de muestra no compromete a la esterilidad del proceso.

En dicho documento deben figurar además:

- *Tamaño de lote:* Indicar la cantidad de unidades que se llenarán, el volumen de llenado y prever un pequeño exceso para compensar el volumen muerto.
- *Medios de cultivo:* Elegir en base a la historia del producto si se empleará un medio de cultivo general para aerobios o si por el contrario debe usarse un medio para anaerobios. Incluir el test de promoción de crecimiento.
- *Tiempos y temperaturas de incubación:* Será una única temperatura?, dos temperaturas?, cuánto tiempo?.
- *Monitoreo ambiental:* Método elegido, mapeo de los cuartos, tiempo de exposición y/o volumen de aire muestreado, condiciones de incubación.
- *Conciliación de unidades y rendimiento.* Tener en cuenta las unidades separadas por merma de producción, positivas y unidades estériles.
- *Evaluación de resultados:* Cuál será el criterio de aprobación.
- *No conformidades:* Acciones correctivas según corresponda. Qué hacer con los productos ya liberados y los que están en cuarentena. Evaluar la posibilidad de interrumpir la fabricación hasta que una vez tomadas acciones, la validación del *media fill* sea satisfactoria.

Condiciones del proceso:

Previamente a la validación del proceso debe realizarse un análisis de riesgo que contemple las peores condiciones en las que el proceso puede llevarse a cabo. Estas "peores condiciones" tienen que tener la posibilidad de su existencia real en el proceso y no ser sólo elucubraciones teóricas.

Las condiciones mínimas a tener en cuenta son:

- *Tiempo máximo (holding time*): Es el tiempo en que el producto puede estar sin ser llenado en su envase final. El medio de cultivo debe prepararse y esterilizarse por filtración manteniéndolo en el recipiente de almacenamiento por el tiempo máximo permitido en la tarea normal de producción.
- *Volumen de llenado:* O bien debe llenarse al valor nominal o bien un volumen algo menor que permita la existencia de una cámara de aire (concentración de oxígeno) que facilite la recuperación y crecimiento de microorganismos aerobios y que además permita el contacto con toda la superficie.
- *Tamaño de lote a ser llenado:* El tiempo de llenado puede ser aumentado en líneas de alta velocidad para tener una visión más representativa del proceso y de sus variables. En ese caso el tamaño de lote será mayor.
- *Velocidad de llenado*: Deben validarse las condiciones extremas de la llenadora (máxima y mínima velocidad). La condición de mínima velocidad permite además evaluar la posible fatiga del operador.
- *Filtración:* Si el producto normalmente es filtrado y llenado bajo atmósfera de Nitrógeno o Anhídrido carbónico, estos gases deben ser reemplazados por aire comprimido para permitir el desarrollo de microorganismos aerobios, a menos que la historia del producto indique la posibilidad de existencia de anaerobios (ver medios de cultivo).

- *Paradas de máquina:* Las interrupciones lógicas que ocurren -apelando a la historia del proceso- como ser rotura de material de empaque primario, trabas en la bajada de la tolva de tapones, reemplazo de agujas llenadoras, reemplazo de filtros, carga de tolva.
- *Personal:* Cantidad máxima de operadores posible dentro del sector. Turnos de trabajo diferentes. Los ensayos deberían realizarse en días y horarios diferentes durante la semana y no solamente al comienzo de la jornada laboral.
- *Equipamiento:* Trenes diferentes de fabricación y llenado para el mismo producto. Áreas diferentes.
- *Muestras:* Retiro de muestras para controles en proceso (volumen, integridad del cierre, otras propiedades).
- *Envase primario:* Geometría del envase primario, los más grandes con la boca más ancha y que estén más expuestos al ambiente, o bien los más pequeños a la mayor velocidad dado que pueden ser inestables y causar derrames e interrupciones de línea. Sistemas de cierre.

Todas estas condiciones deben estar indicadas en la guía de fabricación, cuántas unidades se llenarán como parte del total para cada caso y mantener la secuencia de llenado con los diferentes cambios mencionados a los efectos de poder reconstruir las variables del proceso en caso de aparición de unidades contaminadas. Se recomienda fuertemente el uso de envases primarios con alguna leyenda impresa que indique que se trata de unidades para un determinado ensayo. Bajo ningún aspecto deben emplearse envases primarios con la impresión original de un producto.

De ser posible, la filmación del ensayo puede ser muy útil, del punto de vista de documentación, así como para capacitar al personal.

Frecuencia y cantidad de ensayos:

Desde los primeros documentos sobre el tema y como parte del concepto histórico de validación generalmente aceptado, se recomienda al menos que 3 corridas consecutivas, independientes y satisfactorias sean realizadas durante la calificación de performance de una nueva línea y/o producto y/o tamaño de envase primario [10]. Si los resultados son satisfactorios, el proceso debe revalidarse cada 6 meses como mínimo mediante 1 (un) ensayo. Es importante incorporar estos ensayos como parte de la planificación de la producción para que su realización sea respetada en tiempo y forma.

La aparición de nuevos procesos y/o equipos y/o turnos de trabajo debe ser considerado como si fuera un producto nuevo. La introducción de nuevo personal o bien de más personal que la condición validada también debe ser motivo de evaluación.

En síntesis, cualquier cambio que se solicite para un proceso validado - y el procesamiento aséptico no constituye una excepción - debe ser evaluado para concluir sobre la necesidad o no de revalidar el proceso con otras nuevas 3 corridas satisfactorias.

Para revalidaciones la EMEA recomienda repetir el ensayo dos veces al año, por turno y por proceso y luego de cambios significativos del sistema HVAC, equipos, procesos, cantidad de turnos.

Por otra parte la FDA, indica repetir el ensayo dos veces al año por cada línea incluyendo actividades e intervenciones representativas por cada turno. En un año, todo el personal involucrado en manufactura, incluyendo técnicos y mecánicos debe haber pasado al menos por un *media fill*.

Tamaño de lote de cada ensayo:

Hasta la aparición del documento de la FDA [9] en el año 2004, la cantidad de medio de cultivo necesaria para realizar el *media fill* era de no menos de 3000 unidades [10].

La situación ideal es que el ensayo tenga el mismo tamaño que el lote productivo, **en particular si el proceso tiene una intervención manual en el llenado o tapado.**

Para líneas automáticas que trabajan de manera uniforme, o bien cuando el llenado se realiza dentro de un *isolator,* se recomienda entre 5.000 y 10.000 unidades. Dentro de esas unidades deben estar incluidos los desafíos

mencionados en “Condiciones del proceso”. Si el tamaño de lote es menor a 5000 unidades debería llenarse una cantidad no menor al tamaño de lote.

Durante el llenado aquellas unidades que hubieran sido producto de la merma habitual de producción por defectos en el cierre, rotas, etc. no deben formar parte de la incubación y deben ser descartadas.

Debe realizarse una reconciliación de unidades de la misma manera que un lote productivo para evitar, independientemente de la identificación primaria de dichas unidades, se pueda generar un *mix-up* con un producto de línea.

Medios de cultivo:

Partiendo del hecho que no existe un medio de cultivo ni condiciones de incubación tales que todos los microorganismos puedan desarrollarse, en los *media fill* se emplean medios de cultivo generales, que no sean selectivos, aunque privilegiando la detección de microorganismos aerobios (bacterias y hongos) salvo que la historia del producto indique la posibilidad cierta de existencia de anaerobios, en cuyo caso se empleará un medio de cultivo acorde.

Los criterios de selección del medio de cultivo deben incluir:
- Baja selectividad.
- Claridad del medio.
- Concentración.
- Filterabilidad.
- Capacidad de soportar el crecimiento de una gran variedad de microorganismos.

El medio de cultivo aceptado generalmente es el Caldo Tripteína Soya. En caso de requerirse un medio de cultivo anaeróbico puede emplearse el Caldo Tioglicolato.

Es necesario realizar el test de promoción de crecimiento acorde con criterios internacionales (*United States Pharmacopeia indicator organisms*) y con cepas aisladas de la propia planta, al menos en los envases llenos del ensayo de simulación, y debe obtenerse crecimiento positivo dentro de los 5 días subsiguientes a la inoculación.

El inóculo debe ser menor a 100 unidades formadoras de colonia (UFC) en todo el volumen de medio de cultivo. Es recomendable también realizarlo en el medio de cultivo preparado antes del llenado.

Se indica en la bibliografía [12] cómo debe realizarse el ensayo acorde al producto y envase primario:

- Productos líquidos: Si los envases son opacos (colirios por ejemplo) las unidades deben vaciarse luego de la incubación para verificar la presencia/ausencia de crecimiento en el medio de cultivo. <siempre que sea posible, reemplazar el envase opaco por uno similar pero transparente.
- Productos en polvo: Existen dos posibilidades:
    - Llenar con medio de cultivo líquido los envases primarios.
    - Agregar polvo inerte o medio de cultivo sólido estéril, y luego un líquido estéril (medio de cultivo o agua para inyectables respectivamente) o viceversa, debiendo ser hechos ambos procesos on-line. Si se usan sólidos los más comunes son polietilenglicol 8000 y carboximetilcelulosa esterilizados previamente por irradiación. Esta opción es la que debe tomarse como referencia pues - si bien agrega operaciones adicionales - es la que mejor refleja la condición productiva real. Conviene llenar algunas unidades sólo con líquido para que actúen como control negativo, dado que esta operación doble no es similar al llenado habitual de polvos en el proceso productivo.
- Productos en suspensión: Es similar a otros líquidos con el agregado que la agitación o recirculación debe formar parte de la simulación. Si al granel habitual se le agregan sustancias, éstas deberían estar simuladas con el agregado de líquidos/polvos inertes estériles.
- Liofilización: Debería prevenirse la cristalización del medio de cultivo dado que pueden reducir la probabilidad de recuperación de microorganismos. El método más recomendado es emplear un medio de cultivo líquido y remover el agua hasta un valor determinado de concentración sin llegar a la liofilización, y evitando el uso de gases inertes para romper el vacío de la cámara. Debe tenerse en cuenta la concentración inicial del medio

de cultivo, que debe estar diluido respecto a su concentración habitual para que luego de la evaporación su concentración sea óptima.

- Productos semisólidos (ungüentos): El medio de cultivo líquido es llevado a la viscosidad del producto empleando agar o carboximetilcelulosa estéril. Luego de la incubación los envases son vaciados sobre placas de Petri, mezclados y observados para detectar turbidez o presencia de hongos en condiciones óptimas de iluminación.
- Ingredientes farmacéuticos activos (*Active Product Ingredient*) a granel: Puede ser necesario validar por etapas y no siempre es posible simular con medio de cultivo. Debe analizarse cada proceso en particular.

Condiciones y tiempo de incubación:

Existe un acuerdo generalizado en que la incubación no debe ser inferior a 14 días. Es preferible incubar a dos temperaturas diferentes empezando por la más baja: 20-25 ºC siguiendo por la de 30-35 ºC y no menos de 7 días cada una. Desde punto de vista práctico no suele haber inconvenientes en disponer de recintos voluminosos para la incubación a 20-25 ºC (temperatura lograble con un aire acondicionado convencional) pero no siempre es accesible un espacio para incubar a 30-35 ºC. Puede elegirse una sola temperatura incubando los 14 días en el mismo valor seteado siempre y cuando la variación esté en ±2.5 ºC. Es fundamental también para la elección de la temperatura, la historia de los productos cuando éstos dieron contaminados, con qué medio de cultivo y a qué temperatura de incubación se expresó la contaminación. La razón de incubar primero a baja temperatura es la posibilidad de recuperar microorganismos injuriados o de lento crecimiento.

Otro factor importante para la selección de las temperaturas de incubación es que aproximadamente el 2/3 de los contaminantes hallados históricamente son de origen humano y su temperatura óptima de crecimiento está en 30-35 ºC mientras que 1/3 de contaminantes encontrados son de origen ambiental y su temperatura óptima está en 20-25 ºC.

Antes de iniciar la incubación, los envases debieran ser invertidos o manipulados para mojar todas las superficies. Se recomienda realizarlo también durante el periodo de incubación.

Inspección de las unidades:

El 100% de las unidades deben ser revisadas por personal de microbiología o bien por personal convenientemente entrenado.

Si del revisado surgen unidades contaminadas asociadas a un defecto de integridad de la unidad en esta etapa, este punto debe ser cuidadosamente revisado pues bajo circunstancias normales de producción esas unidades podrían llegar al mercado y ser administradas a un paciente.

Los microorganismos hallados debieran ser identificados preferiblemente hasta nivel de especie.

La lectura de las unidades debe ser hecha por comparación con un medio patrón estéril.

Interpretación de los resultados:

En 2004 la FDA emitió un documento [5] que reemplazó el criterio originalmente establecido de 0.1% de unidades contaminadas con el 95% de confianza estadística [10] donde indica que el objetivo deber ser **cero unidades contaminadas en función de la tecnología actualmente disponible.** Diversas organizaciones ya se han manifestado con el mismo criterio [13,14,15,16]. La disposición 3827-2018 de la ANMAT [19] ha armonizado este criterio. Deberían aplicarse entonces los siguientes criterios armonizados:

- Cuando se llenan menos de 5000 unidades, ninguna unidad contaminada debe detectarse. La presencia de una unidad contaminada es motivo de revalidación e investigación.

- Cuando se llenan entre 5.000 y 10.000 unidades, una unidad contaminada debería iniciar una investigación, incluyendo la de repetir *el media fill*. Dos unidades contaminadas son consideradas causa de revalidación, con la investigación consiguiente.

- Cuando se llenan más de 10.000 unidades, una unidad contaminada debería resultar en una investigación. Dos unidades contaminadas son consideradas causa de revalidación, con la investigación consiguiente.

Es preciso también reconocer que será difícil lograr ese objetivo en líneas manuales y con elevada intervención humana.

Si los datos no son satisfactorios, debe evaluarse el impacto sobre los productos manufacturados desde la última validación satisfactoria y reevaluar su liberación. Por ello es fundamental en este estudio registrar cualquier anormalidad y ver si se correlaciona con las unidades que aparecen contaminadas.

No se han tenido en cuenta en este capítulo otras interpretaciones del ensayo de *media fill* entre el periodo 1987-2004 para no generar confusión entre los lectores. No obstante ello, están indicadas en la bibliografía [17,18].

La revalidación debe ser una tarea normal en los estudios de simulación. En ella debe revisarse y compararse con la validación original lo siguiente:

- Monitoreo ambiental, procesos de desinfección, limpieza de equipos y esterilización (incluyendo recipientes y cierres). **Es importante destacar que la actividad de monitoreo en sí misma no implica necesariamente comprometer la calidad del producto.** Para las áreas que rodean al área de llenado deben elegirse los sectores de mayor movimiento de personal. Para el llenado, lo más cerca posible del mismo y siempre donde haya mayor actividad del personal.
- Mantenimiento rutinario y recalificación de equipos (autoclaves, hornos, sistema de aire-calefacción, ventilación, aire acondicionado), sistemas de agua.
- Testeo rutinario de integridad de filtros, recipientes, cierres y filtros de venteo.
- Entrenamiento del personal. El personal constituye una de las principales fuentes de contaminación microbiológica. Debe existir un programa de entrenamiento formal no sólo para los operarios del área sino también para el personal de control de calidad e ingeniería. El entrenamiento debe incluir conocimientos de Microbiología, GMP, desinfección, conexiones asépticas, procedimientos de vestimenta, límites de alerta y acción, métodos de muestreo. El personal que evalúa las unidades después del test de simulación debe tener revisiones visuales periódicas.
- Revalidación luego de cambios.

En caso de no conformidad con los ensayos originales o bien con la revalidación es necesario iniciar una investigación profunda. [18]

Los puntos más salientes de la investigación deberían incluir:

- Identificación de la contaminación, de ser posible hasta nivel de especie.
- Revisión de los datos de monitoreo ambiental y del personal del último año.
- Revisión de la documentación generada en el *media fill* para detectar posibles anomalías.
- Revisión de los procesos de esterilización y su estado de calificación.
- Revisión de los procesos de descontaminación.
- Revisión de los datos del sistema HVAC, particularmente los vinculados al mantenimiento de la presión diferencial e integridad de filtros.
- Revisión del estado de calificación de equipos y calibración de instrumentos (agua para inyectables, agua purificada, aire comprimido, etc.) empleados en el proceso.
- Revisión de los procedimientos de limpieza y desinfección y cómo han sido ejecutados.
- Revisión del entrenamiento y calificación de todo el personal, aún el involucrado en la limpieza.
- Revisión de cualquier cambio que pudiera haber ocurrido desde el último *media fill* satisfactorio.
- En qué instancias aparece la contaminación: creciente durante el llenado (conexiones asépticas deficientes), decreciente durante el llenado (contaminación producida en el *set up* y que luego es “lavada” durante el

llenado, contaminación puntual (intervención humana incorrecta) o bien contaminaciones aisladas pero múltiples (indicación de un proceso fuera de control).

La cantidad de corridas a repetir en el caso de no conformidades puede variar entre una (si la causa raíz fue descubierta y se tomaron acciones correctivas) hasta tres (en caso de no detectarse la causa raíz y probar con diferentes modificaciones).

Informe final:

Debe contener la siguiente información [18]:

- Nombres del personal que participaron en los respectivos ensayos de simulación.
- Cantidad de unidades llenadas.
- Cantidad de unidades incubadas.
- Tiempo de incubación y temperatura.
- Cantidad de unidades positivas e identificación de las cajas o bandejas de cada unidad positiva.
- Cantidad de unidades rechazadas a causa de la inspección pre-incubación (recipientes dañados, cierres defectuosos).
- Test de promoción de crecimiento de los medios de cultivo luego de la incubación.
- Conciliación de unidades.
- Identificación de filtros y resultados de los test de integridad de las membranas.
- Resultados de monitoreo ambiental y del personal.
- Registro de eventos ocurridos durante la simulación.
- Registro de desvíos al protocolo.

Este informe final con sus respectivas conclusiones en base a los criterios de aceptación, investigación de la causa-raíz en caso de unidades contaminadas y posibles acciones correctivas y preventivas en caso de ser necesario, debe estar aprobado, firmado y fechado por Aseguramiento de Calidad.

Conclusiones:

1) La validación de procesos asépticos aún constituye un desafío para la industria farmacéutica dado que los resultados obtenidos únicamente reflejan que sólo han sido satisfactorios en los momentos en que dicha validación fue realizada.

2) El proceso de *media fill* debe estar documentado acorde a las Buenas Prácticas de Fabricación de productos farmacéuticos.

3) Ha habido una evolución permanente en los criterios de aceptación del *media fill* con el correr del tiempo. Desde el 0.1% directo de unidades contaminadas, pasando por el 0.1% con 95% de confianza estadística, y hasta la ausencia de unidades contaminadas actual, refleja el avance tecnológico producido que permite lograr el objetivo final y que siempre fue el mismo de **cero contaminación.** Ese avance tecnológico se funda principalmente en la cada vez menor intervención humana a través del uso de aisladores y tecnología de soplado/ llenado/ sellado.

4) Un paso fundamental en la interpretación de los resultados ha sido dado con la armonización de criterios entre FDA, EMEA y PIC/S y la aparición de los mismos criterios en la disp. 3827-ANMAT anexo 1.

5) No existe el *media fill* ideal teniendo en cuenta la cantidad de variables que entran en juego en el proceso real de producción, y por lo tanto en el de simulación con medio de cultivo. Por ello es fundamental emplear herramientas de análisis de riesgo para definir el proceso desde su diseño y validarlo acorde al mismo.

Bibliografía:

1. Disposición ANMAT 2819, *Liberación Paramétrica*, Anexo III. 2004.
2. PIC/S *Recommendation on Guidance on Parametric Release*, PI 005-3, September 2007.
3. Disposición ANMAT 2819. *Tecnología del aislador*, Capítulo 18, punto 24. 2004.
4. PIC/S Recommendation: *Isolators used for aseptic processing and sterility testing*. PI 014-3, September 2007.
5. FDA, Guidance for Industry. *Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice, Aseptic Processing Isolators*. Appendix 1, 2004.
6. WHO, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, 44 Report, *Isolator Technology*, page 227, 2010.
7. Joseph M. Juran y Frank M. Gryna, *Redundancy*, Quality Control Handbook, 4th Edition, 23.90-23.91, 1988.
8. USP, <1211> *Sterilization and Sterility Assurance of Compendial* Articles, 33rd Edition. 2010.
9. FDA, *Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice*, 4. Size of runs, page 23, 2004.
10. FDA, *Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing*, 1987.
11. PIC/S Recommendation: GMP Annex 1 Revision 2008, *Interpretation of most important changes for the manufacture of Sterile Medicinal Products*, PI 032-2, January 2010.
12. PIC/S *Recommendation on the Validation of Aseptic Processes* 2008, PI 007-5, July 2009.
13. PIC/S *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products*, Annex 1, page 11, September 2009.
14. European Commission, EU *Guidelines to Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Manufacture of Sterile Medicinal Products* (corrected version), page 11, March 2009.
15. WHO, Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, 44 Report, *Isolator Technology*, page 220, 2010.
16. Health Products and Food Branch Inspectorate. Canada. *Good Manufacturing Practices* (GMP) Guidelines, GUI-001, pages 78-79, November 2009.
17. The Parenteral Society. *The use of process simulation tests in the evaluation of processes for the manufacture of sterile products*, Technical Monograph Nº. 4, June 1993.
18. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. *Process Simulation Testing for Aseptically Filled Products*, Technical Report Nº. 22, 2011.
19. Disposición 3827-2018 ANMAT Guía de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos de Uso Humano

Abreviaturas:

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

FDA: *Food and Drug Administration*.

EMEA: *European Medicines Agency.*

HVAC: Heating, Ventilating, and Air Conditioning

PDA: Parenteral Drug Association.

PIC/S: Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme

USP: United States Pharmacopeia.

WHO: World Health Organization.

EU: European Union.

Capítulo IV.5.

Validación de limpieza de equipos productivos

Christian Uriarte

Introducción

Marco teórico

Validar desde el diseño

Diseño del proceso de limpieza

Análisis de Riesgo

Nivel de aceptación o criterio de aceptación

Selección de puntos críticos de muestreo en equipos a través del análisis de riesgos

Introducción

Para comenzar a describir los pasos que son necesarios transitar durante tareas relacionadas a la validación de limpieza, se debe enmarcar el entorno en el cual las mismas tendrán lugar. Dicho escenario puede evaluarse yendo desde lo simple a lo complejo, y desde este punto a lo abstracto, donde el desafío es confrontar las dificultades a través del conocimiento y no desde el azar. Tomar el tiempo necesario para pensar la relación causal de los efectos encontrados permite recorrer el camino inevitable de la comprensión de los hechos. De esta manera se puede diseñar y desarrollar exitosamente un trabajo cuyo punto final tiene por objetivo sostener la calidad de los medicamentos en pos de dar seguridad a los pacientes.

Habitualmente, toda la información relativa al alcance de la validación como ser: tipo de procesos, equipos, tipo de residuos, estrategia, enfoque, etc. es consolidada en un documento llamado Plan Maestro. En el mismo, además de incluir todo lo anteriormente mencionado, debe quedar explícito el tipo de tratamiento que recibirá la gestión de riesgos para establecer, entre otras cosas, la criticidad relativa de cada uno de los residuos que deseamos mantener bajo control. Mantener "bajo control" guarda implícitamente la aceptación que nunca se puede afirmar que los residuos son eliminados completamente, sino que los mismos están por debajo de un valor seguro de aceptación. Para ello el Plan Maestro debe especificar el modo de cálculo de dicho criterio y los racionales que respaldan los límites para la aceptación de la contaminación, por ejemplo, cruzada entre principios activos, microbiológica o por agentes de limpieza.

En el presente la Industria Farmacéutica exige adoptar un enfoque tomado desde la Gestión de Riesgos. Para lo cual es globalmente aceptada la guía ICH Q9 "QUALITY RISK MANAGEMENT" (Gestión de Riesgos para la Calidad) que presenta un tratamiento integral para el manejo de riesgos. En la misma guía se muestran herramientas de aplicación comúnmente utilizadas como ser, HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) o FMEA (*Failure Mode and Effects Analysis*). El Plan debe explicar que herramienta utiliza, además de cómo y cuándo aplica su uso.

Hoy validar significa abordar tareas que van desde el "Diseño" y durante todo el "Ciclo de Vida" del Proceso. Un Plan busca anticipar todas las posibles variables que puedan afectar el desarrollo de la validación, dicho de otro modo, trata de no dejar cabos sueltos que permitan introducir variabilidad no contemplada a las acciones que se llevan adelante. Es por ello que, además de lo anteriormente mencionado, en el mismo se deben otorgar las debidas responsabilidades que van a obedecer a la estructura jerárquica de la organización y que dan respaldo expreso a los trabajos de validaciones.

Este documento, además de ser formalmente requerido ante una auditoría regulatoria es la primera vía oficial de comunicación interna a los sectores que prestan colaboración de manera continua. Las tareas de validaciones cruzan transversalmente todas las áreas, y un líder en Validaciones encuentra el éxito cuando gestiona sinérgicamente el conocimiento suministrado por los demás constituyentes del equipo que convoca para las mismas.

Se debe construir un cronograma donde se proyecten las tareas y los tiempos necesarios para llevar adelante las corridas de validación. Esto permite a cada uno de los colaboradores saber cuál es su rol y responsabilidad de manera clara. De este modo se puede prever la asignación de recursos o tener en consideración si habrá cortes de planificación de elaboración por dichos ejercicios. Además debe quedar claro el tipo de documentación a utilizar, el tratamiento de la misma dentro de un enfoque de "Buenas Prácticas" y los diferentes responsables que deben revisar y evaluar según su pericia la aplicación de criterios, como ser: Ingeniería en lo que respecta a la calificación de los Equipos y Sistemas de Servicios correspondientes, Desarrollo en lo que refiere al conocimiento del producto que se debe limpiar, Producción de acuerdo a la experiencia real en la aplicación y respuesta de los procesos de limpieza, etc.

Como se ha mencionado más arriba, estos son solo ejemplos ya que la estrategia siempre va a estar vinculada a la estructura de la organización para la cual llevamos a cabo las tareas. No obstante, un enfoque multidisciplinario es requerido y si no se cuenta con algún sector especializado, el mismo debe ser contratado de manera externa.

A continuación se amplía la información buscando cubrir los puntos más relevantes arriba mencionados.

Marco teórico

Según el alcance de este capítulo, se llama Limpieza al proceso que permite eliminar residuos contaminantes de equipos productivos y al mantenimiento de su inocuidad para que los mismos puedan ser utilizados de manera segura en fabricaciones subsiguientes.

Habitualmente la limpieza es considerada el último paso de un proceso productivo…

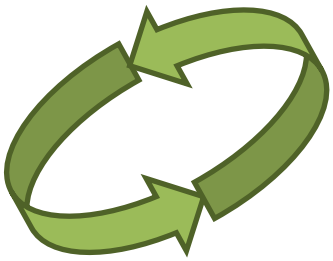


Figura 1: *Ciclo continuo de los procesos*

…pero realmente es el primer paso crítico de cualquier elaboración, como se esquematiza en la Figura 1.

Si la limpieza falla puede tener consecuencias que van desde pérdidas económicas hasta daños directos a pacientes a los que se administra la medicación.

A continuación se enumeran en orden de relevancia los objetivos a considerar al momento de evaluar una limpieza eficiente:

1. *Preservar la integridad de los productos*
2. *Poder reutilizar los equipos*
3. *Cumplir con los requerimientos regulatorios*

El orden elegido no resta importancia al cumplimiento normativo, solamente busca destacar que la elaboración de medicamentos es por defecto llevada a cabo en un entorno regulado obligatorio y por lo tanto no debería ser el objetivo principal de nuestra limpieza. La reutilización de equipos es necesaria para obtener procesos económicamente sustentables con medicamentos que puedan estar al alcance de la población que los necesita.

De esta forma, se puede considerar la integridad de los productos como centro de toda limpieza, vinculando simplemente el proceso de limpieza a la definición de calidad, que no es ni más ni menos que la de obtener un producto que responda a la intención de uso pretendido. Dicho de otro modo, obtener un producto con un residuo contaminante, sea éste un ingrediente farmacéutico activo (IFA) o excipiente no declarado en fórmula, un microorganismo específico u objetable, el resto de un agente de limpieza o tan solo un resto de material físico de empaque o de algún implemento necesario para llevar a cabo el proceso, ocasiona pérdida de calidad que puede ir desde la no aceptación del medicamento por parte del paciente hasta provocar su muerte.

Tomando la definición de residuo como "parte o porción" que queda de un todo, se puede pensar que una limpieza eficiente será aquella que disminuye esas partes remanentes a valores de aceptabilidad que no pongan en riesgo los productos que se fabrican a continuación.

Evaluar el medio ambiente en el cual fabricamos los medicamentos y pensar en las diferentes etapas de elaboración, muestra que los residuos pueden incorporarse a los medicamentos desde el momento del fraccionamiento de las materias primas, durante la elaboración propiamente dicha, al acondicionar o envasar un producto, o durante el muestreo llevado a cabo para el control productivo o de calidad de éstos. Todas estas acciones están regidas por procedimientos operativos estandarizados que, llevados a cabo por personal pueden convertirse directa o indirectamente en vectores de transferencia de residuos. Es la razón por lo que la acción preliminar de una validación de limpieza está relacionada directamente con la verificación del correcto entrenamiento del personal en diferentes niveles que van desde el proceso de limpieza o elaboración propiamente dicha, hasta la vestimenta y el manejo de contingencias.

Finalmente se debe considerar la peligrosidad relativa de los residuos. Esta puede relacionarse a la toxicidad intrínseca de las sustancias. Un ingrediente farmacéutico activo como contaminante puede ocasionar una acción terapéutica no deseada sobre un paciente, que en riesgo puede ir desde la no percepción hasta una reacción anafiláctica si el mismo fuera sensible a dicha sustancia. Por esta razón, los medicamentos cuyas fórmulas contienen penicilina o derivados de ella, deben utilizar normativamente áreas de fabricación segregadas con manejo y tratamiento de aire dedicado. Desde esta perspectiva, no se debe acotar la evaluación sólo a los ingredientes farmacéuticos activos, tal es el caso de los excipientes que pueden ocasionar también problemas de salud de esta característica, como ser el gluten en pacientes celíacos.

Además de lo anteriormente mencionado, la peligrosidad puede estar asociada a la vía de administración de los medicamentos. Es así como una pelusa de un paño utilizado para secar un equipo como residuo contaminante de una forma farmacéutica utilizada *per oral,* no tendría el mismo impacto que otra cuya administración es parenteral u oftalmológica.

Todas estas aristas son consideradas al momento de construir las bases del conocimiento. Los racionales asumidos deben ser sólidos, construidos desde la comprensión de los sistemas y procesos que, a modo de cimiento, deben otorgar el mayor margen de seguridad para lograr predecir la variabilidad, aumentar la robustez y así poder soportar las decisiones cotidianas en un entorno productivo, cuyos valores son regidos por la celeridad de las operaciones que buscan lograr la mejor rentabilidad de la Compañía.

Validar desde el Diseño

En los comienzos existía la premisa que la calidad se controlaba y todo el enfoque apuntaba a un buen plan experimental de muestreo. De esta manera se podía decidir, en el mejor de los casos de forma estadística, si una población reducida de muestras representaba el universo del proceso. Luego con el pasar de los años se adopta la idea que "la calidad se construye". Aquí se incorporan los procedimientos operativos estándar, el control de áreas e insumos, la capacitación del personal, etc.; es decir, un conjunto de acciones predeterminadas para delimitar el ámbito en el cual se llevan a cabo las tareas. Es en este momento donde se incorpora el término de "validación" adoptando la premisa del control sobre las operaciones del proceso. Así se elige y fija un camino de varios posibles dentro de un laberinto de posibilidades, y sin conocer el por qué del recorrido que se toma, se afirma que siguiendo las instrucciones del mapa fijado se puede arribar siempre de la misma manera al final previamente probado. Esto es lo que se denomina "reproducibilidad" de los procesos y que a modo de ejemplo se muestra en la Figura 2.

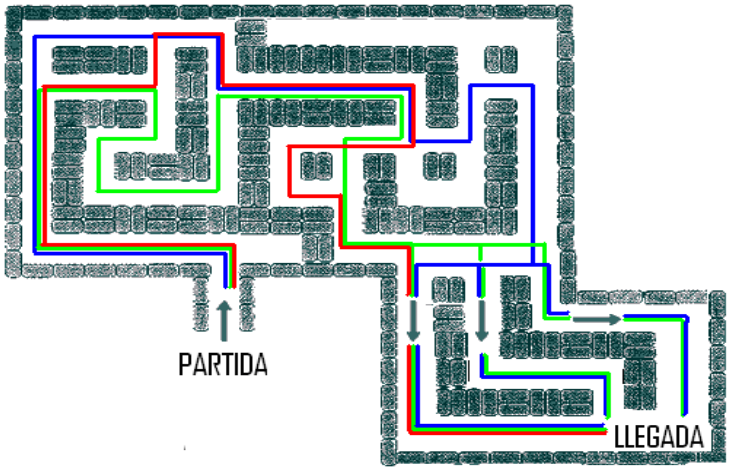


Figura 2: *Analogía de reproducibilidad en enfoque de Validación tradicional.*

Se toma el punto de partida como el inicio del proceso, el de llegada como el resultado pretendido y los diferentes colores son los caminos que el mismo podría seguir. Reproducibilidad es fijar el camino y demostrar que al seguir siempre la misma trayectoria se obtiene el mismo resultado, exigiendo mínimamente 3 repeticiones como necesarias para aceptar el ejercicio de validación.

Hoy con las nuevas guías y normas, el paradigma de validar cambió, en ellas se exige "validar desde el diseño"[1]. Esto significa que cada trayectoria elegida debe ser comprendida y tener respaldo científico en las decisiones adoptadas. Contemplando lo citado en el párrafo anterior, en el pasado validar implicaba "controlar" la reproducibilidad de los procesos de limpieza una vez que estos lograban encontrar buenos resultados a través de ensayos prueba y error. Nadie iba a cuestionar el resultado desde el "por qué", ni si el proceso encontrado era el óptimo para garantizar su eficiencia frente a posibles variables no contempladas al momento de llevar a cabo los ejercicios de validación.

Validar desde el diseño apunta a conocer de antemano cuales son los "factores" aportados por el producto que le atribuirán determinadas "características" a sus residuos de acuerdo a diferentes "condiciones" de elaboración según el equipo que se desea limpiar y que podrían afectar los procesos de limpieza. Con esta información podemos trazar el espectro de limpieza para delimitar el área de estudio (Ver Tabla 1).

Limpieza automática	Limpieza manual
Limpieza CIP (clean-in-place)	Limpieza COP (clean-out-place)
Equipo dedicado	Equipo no dedicado
Superficie en contacto indirecto con el producto	Superficie en contacto directo con el producto
Sitio de bajo riesgo	Sitio de alto riesgo
Equipo menor	Equipo mayor
Formulaciones líquidas	Formulaciones sólidas
Producto de fácil limpieza	Producto de difícil limpieza
Materiales lisos sin poros en superficie	Materiales porosos
Planta de único producto	Planta multiproducto
No se produce en campaña	Se produce en campaña

Tabla 1: Espectro de limpieza [2]

El espectro permite cruzar las diferentes posibilidades que podrían configurar la relación entre las características del producto y la oportunidad que ofrece el equipo de acuerdo a su diseño funcional y materiales, para llevar a cabo su limpieza. De esta manera se pueden definir los diferentes parámetros operativos del proceso de limpieza que deberán contrarrestar los factores aportados por el producto. Generalmente para establecer un proceso de limpieza aceptable, o confirmar un proceso de limpieza para un nuevo producto que está siendo introducido en Planta, se deben seguir una progresión estándar de actividades que comienzan por identificar las variables de control, medir la limpieza y construir criterios. La experimentación en el laboratorio junto con los requerimientos específicos de los equipos puede proveer información para establecer los rangos de control de los parámetros operacionales de proceso.

Diseño del Proceso de Limpieza

En primera instancia, se debe elegir el agente de limpieza adecuado para el tipo de residuo que se desea remover. Los agentes de limpieza poseen diferentes mecanismos de acción que, en conjunto con la condición de aplicación, pueden aumentar o disminuir su eficiencia. Los mismos no deben dañar al equipo y su aplicación debe efectuarse en condiciones seguras que no pongan en riesgo la integridad física de las personas que llevan adelante la operación.

Los proveedores de agentes de limpieza deben ser reconocidos; esto brinda soporte al momento de solicitar información de los insumos que nos proveen, como ser la Hoja de Seguridad del producto y los componentes de su fórmula. Datos toxicológicos son parte del cálculo del criterio de aceptación para el residuo remanente del agente de limpieza que se está introduciendo durante el proceso. Tal cual se menciona al comienzo de este capítulo, cualquier parte de un todo que no pertenezca al medicamento que va a ser elaborado a continuación, es un residuo contaminante y se debe dar garantía de que el mismo está por debajo de un valor seguro de aceptación.

Retomando, otros puntos que idealmente deberíamos considerar al momento de elegir el agente de limpieza durante la fase de diseño son:

- El producto debe estar aprobado para uso farmacéutico
- Debe presentar baja toxicidad
- Debe presentar fácil remoción
- Tener características funcionales acordes al tipo de limpieza que vamos a efectuar
- Presentar especificidad para el residuo de limpieza
- En lo posible debe ser económico
- Se debería poder Auditar al fabricante quien también nos debería informar si efectúa cambios sobre el proceso de obtención del producto

Todas estas cuestiones aportan seguridad en la elección sobre las diferentes alternativas de productos existentes en el mercado. En relación a los últimos puntos cabe mencionar que iniciar tareas de validación involucra mucho esfuerzo, tiempo y coordinación además de costos. No se puede perder un estatus de validación exitoso obtenido sobre un proceso, por haber hecho prevalecer al momento de la elección el costo de un agente de limpieza que luego no puede ser adquirido o presenta fallas en los resultados por no ser un producto de calidad constante.

Hasta aquí se detallan las características a tener en cuenta para seleccionar un agente de limpieza, pero este es solo uno de los eslabones necesarios para definir al proceso. Además de ello, se deben establecer cuales parámetros operativos son críticos. Un proceso puede ser dividido en pasos, y cada paso a su vez tiene parámetros específicos con rangos variables definidos. Estos rangos correctamente estudiados permiten garantizar la eliminación de residuos. Una herramienta útil para el estudio de estos parámetros y sus rangos es el Diseño de Experimentos que además de encontrar los valores óptimos de cada uno de ellos, nos brinda la posibilidad de reducir el número de corridas durante los ensayos y además nos muestra posibles interacciones que se pudieran presentar entre ellos. Cómo llevar adelante un Diseño de experimentos excede el propósito de este capítulo, pero cabe mencionar que el uso en conjunto del Análisis de Riesgos y el Diseño de Experimentos permite elaborar desarrollos de procesos científicamente más sólidos y respaldados desde la comprensión de los hechos.

Cuando se habla de un proceso de limpieza, se pueden citar múltiples pasos que acompañan la remoción de los residuos. Aquellos que están involucrados en la limpieza propiamente dicha y otros que pueden aportar mejoras en la eficiencia o simplemente reducir tiempo o costos. A modo de ejemplo podemos tomar los citados a continuación (Ver Tabla 2):

Paso	Objetivo	Parámetros de proceso	Control del paso	Observaciones
Aspiración o enjuague inicial dependiendo de la forma farmacéutica	Disminuir la carga total de producto a limpiar	Vacío	Visual	La reducción de carga permite mejorar la eficiencia de la limpieza y ahorrar costos por utilizar menor cantidad de agente de limpieza
		Presión de barrido	Tiempo	
Desarme de piezas	Aumentar eficiencia de limpieza	No posee	Por procedimiento	Puede estar asociado a limpieza manual y utilizar tratamientos de piezas en ultrasonido para facilitar limpieza
Limpieza con agentes	Remover los residuos adheridos	Tiempo	Cronómetro	Paso que pone en juego todo el conocimiento previamente adquirido sobre el residuo y el agente de limpieza
		Acción mecánica	Presión/Cepillado	
		Temperatura	Rango determinado	
		Concentración	Especifica	
Enjuague con agua potable	Erradicar residuos fuera del equipo que fueron removidos en el paso anterior	Tiempo	Cronómetro	Este paso es tan importante como el anterior. Si los residuos removidos no son correctamente enjuagados, la limpieza falla y todo el esfuerzo hasta aquí invertido es en vano.
		Acción mecánica	Presión	
		Temperatura	Rango determinado	
		Caudal	Volumen/Tiempo	
Enjuague final	Estandarizar la calidad del enjuague final del equipo según producto que es fabricado en él	Tiempo	Cronómetro	Este paso es de cumplimiento normativo y busca que la calidad de agua final utilizada sea acorde al tipo de producto que será fabricado en el equipo. Ejemplos, Vía oral: Agua Purificada, Vía Parenteral: Agua para inyectables, etc.
		Temperatura	Rango predeterminado	
		Caudal	Volumen/Tiempo	
Secado	Eliminar restos de agua	Modo	Aire Comprimido/ Paño/ Vacío	El secado es esencial para prevenir la proliferación bacteriana. Un equipo que fue correctamente limpiado, pero no fue secado de manera completa, puede a través del tiempo desarrollar contaminación microbiológica
		Temperatura	Rango determinado	
		Tiempo	Cronómetro	
Sanitizado	Eliminar posible carga microbiana	Modo	Agentes sanitizantes físicos (calor), químicos (productos o alcohol, etc.)	Este proceso debe adecuarse al tipo de producto fabricado en equipo. Se deben establecer agentes sanitizantes adecuados y rotación específica sobre un tiempo establecido y previamente estudiado.
		Temperatura	Rango determinado	
		Tiempo	Cronómetro	

Tabla 2: *Ejemplo de pasos constituyentes de procesos de limpieza*

Los pasos tomados como ejemplo en el cuadro son habitualmente características funcionales conocidas que guardan relación al equipo y procesos de limpieza llevados a cabo comúnmente a nivel productivo. Es decir, los estudios de diseño de un proceso de limpieza por lo general toman como referencia el funcionamiento y posibilidades que permite llevar adelante el equipo para luego vincular esto a los factores particulares del residuo que queremos limpiar, a sus características y condiciones particulares del producto elaborado, es lo que más arriba definimos como espectro de limpieza. Es de esperar que un mismo equipo sea utilizado para la fabricación de varios productos cuyos residuos pueden poseer diferentes comportamientos. El modo de resumir tareas de validación de limpieza es encontrar un proceso que sea capaz de garantizar la remoción de todos los residuos aportados por dichos productos. Para ello se deben centrar los esfuerzos, siempre que sea posible, en el criterio de "peor caso". Esto significa encontrar al residuo que presenta mayor dificultad de remoción y diseñar un proceso de limpieza que sea capaz de removerlo del equipo. Luego la reproducción exacta de este proceso garantiza que todos los demás residuos que presentan menor dificultad de remoción encontrarán una limpieza exitosa. El modo a seguir para llevar adelante dicha categorización es a través del Análisis de Riesgos.

Análisis de Riesgos

Introducción:

El manejo de riesgos es un proceso sistemático de valoración, control, comunicación y revisión de riesgos para la calidad de los productos. La valoración de riesgos obedece a tareas de identificación de peligros y al análisis y evaluación de los riesgos asociados. Hay tres preguntas que son de gran ayuda para valorar los riesgos:

1. ¿Qué puede salir mal? (Identificación de peligros)
2. ¿Cuál es la probabilidad de que salga mal? (Estimación del riesgo asociado al peligro identificado)
3. ¿Cuáles son las consecuencias de que salga mal? (Severidad)

Para identificar los peligros se debe comprender que los mismos no residen en las cosas sino en su manipulación, que estos pueden ser reales o potenciales, y además su expresión es causa potencial de daño. Se define como daño a todo aquello que afecta a la salud, incluyendo la pérdida de calidad o disponibilidad del producto. El Riesgo combina la probabilidad de ocurrencia de un daño con su Severidad, siendo esta última la manera de medir la posible consecuencia que puede ocasionar un peligro.

Luego de identificar y analizar, solo resta Evaluar los riesgos, que sería comparar los resultados obtenidos con el criterio de aceptación preestablecido.

Aplicación del Análisis de Riesgos

En limpieza los usos del análisis de riesgos más reconocidos pueden estar asociados a la selección del residuo "peor caso" del enfoque químico, o a la selección de los puntos críticos de control que serán muestreados en los equipos para medir la limpieza. Además, tal cual se menciona más arriba, se puede también utilizar esta herramienta para establecer puntos críticos de la limpieza propiamente dicha, al momento del diseño y comprensión de los pasos del proceso, por ejemplo, la temperatura para el desarrollo óptimo del mecanismo de acción de un agente de limpieza.

Consideraciones para establecer IFA "peor caso":

Tomando las preguntas citadas al comienzo, se deben contemplar los diferentes factores que le otorgan características diferenciales a los peligros asociados a la limpieza.

1- ¿Qué característica del producto puede hacer que una limpieza no sea exitosa?
   a. Incidencia directa
      i. Solubilidad del ingrediente activo
      ii. Potencia
   b. Incidencia relativa
      i. Frecuencia de fabricación / producción en campaña
      ii. Dificultad empírica de limpieza

2- ¿Cuál es la probabilidad que dichas características aporten un riesgo para la obtención de una limpieza exitosa?
   a. Incidencia directa
      i. A menor solubilidad en el solvente, generalmente agua, mayor probabilidad de no ser limpiado fácilmente. Aclaración: Agentes de limpieza u otros solventes pueden y son comúnmente utilizados para mejorar características de la limpieza. En este caso se vuelve a tomar el criterio de "peor caso" para efectuar la comparación relativa entre los diferentes residuos teniendo en cuenta solamente la solubilidad en agua.
      ii. A mayor potencia del IFA, mayor riesgo de que pequeñas cantidades aporten un peligro de contaminación al producto siguiente.

   b. Incidencia indirecta
      i. La frecuencia de fabricación en relación directa con la producción en campaña, pueden aportar una medida relativa de comparación entre los diferentes candidatos que están en evaluación. Por ejemplo, si se tienen productos cuya fabricación es muy frecuente y además se elaboran en

campaña tendrán mayor peso en la categorización en relación a otros cuya fabricación sea de pocos lotes al año. Una explicación rápida guarda concordancia en que la probabilidad de falla de un proceso de limpieza aumenta si con mayor frecuencia se aplica el mismo. Además, si el producto se fabrica en campaña, el residuo del producto puede cambiar sus características por incrustación en piezas o por cambios morfológicos al aumentar la permanencia en el equipo. Un último aspecto, que indirectamente favorece los ejercicios de validación es que, si el proceso se aplica de manera frecuente, se podrían cerrar los mismos en períodos más cortos. Por este motivo, si un producto es categorizado "peor caso" pero tiene una frecuencia relativa de fabricación muy baja, se debe elegir otro de "menor riesgo relativo" dentro de todos los ponderados que pueda cubrir el resto de los productos para cerrar las prácticas de validación y otorgar un tratamiento de "verificación de limpieza" para este producto en particular. Un tratamiento de verificación de limpieza sólo evaluará la seguridad del producto subsiguiente, cada vez que se elabore aquel que consideramos "peor caso" y que quedó por fuera de los productos cubiertos por nuestra validación.

ii. En la práctica se pueden evaluar el comportamiento real del producto y los factores del residuo que se oponen a la limpieza que hemos diseñado. En esta instancia se ponen en juego todos los racionales teóricos contemplados y aquellos que no tuvimos en cuenta y pueden atentar contra la obtención de una limpieza exitosa. Aquí el residuo del IFA interacciona con la fórmula del producto, con los agentes de limpieza y con las condiciones de limpieza. Por ejemplo hay residuos cuya solubilidad aumenta en agua caliente y otros en los que disminuye. Un caso típico son los residuos de lípidos que, al interaccionar con surfactantes no iónicos y temperatura, suelen emulsificarse en gotas y muestran más afinidad con las colas carbonadas del mismo aumentando la eficiencia de la limpieza. En cambio, matrices para liberación prolongada de IFAs, por ejemplo hidroxi-propil-metil-celulosa, suelen tener mejor resultado por utilización de agentes alcalinos y temperaturas menores a 60 ºC. Es por ello que la categorización de este factor de riesgo es uno de los de mayor peso al momento del análisis.

3- ¿Cuáles son las consecuencias de que la limpieza salga mal?

Aquí, como se menciona con anterioridad, debemos contemplar el daño. Para ello tendremos en cuenta la toxicidad del IFA. A mayor toxicidad, mayor peligrosidad de los residuos contaminantes. En este caso hay que considerar las diferentes cuestiones relativas al conocimiento de los productos que debemos limpiar y tener en cuenta el impacto real del IFA "contaminante" en el producto "contaminado". Habitualmente son utilizados valores de toxicidad aguda tomados desde el valor de la LD_{50}, y comparados de manera directa. Para considerar una explicación rápida y poco abarcativa pero con el solo fin de entender su uso, la LD_{50} sería la dosis que provoca la muerte en el 50% de una población de animales de laboratorio, comúnmente ratas o ratones, aunque según la aplicación toxicológica deseada, pueden ser otros animales. Si una menor dosis causa dicho resultado, entonces presenta mayor toxicidad relativa al resto de las comparadas. Una cuestión a considerar en relación a lo anteriormente explicado es que, al utilizar esta comparación para asignar peligrosidad según toxicidad, el analista debe asegurar que los valores de la LD_{50} deben corresponder a la misma especie y vía de administración de las formas farmacéuticas cuyos procesos debe validar, de otra manera el mismo puede incurrir en un error ya que estas diferentes posibilidades presentan distintos resultados.

Otro punto a considerar cuando se utilizan estos valores es que, drogas altamente potentes de alta LD_{50} pueden ocasionar efectos terapéuticos no deseados en los pacientes que reciben la medicación "contaminada" mucho antes de producir efectos tóxicos. Si se tiene en cuenta que anteriormente el propósito de la limpieza fue definido en obtener productos que respondan a su intención de uso, entonces debemos buscar otros parámetros de toxicidad que contemplen este tipo de situación. Es por ello que en la actualidad, las guías [(2)] basan sus cálculos en el NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) para el cálculo del PDE (*Permitted daily exposure*) que garantiza que por debajo de este nivel, una persona expuesta diariamente durante toda su vida, a una sustancia específica, tiene bajas probabilidades de tener algún efecto adverso. Esta comparación, utilizada para drogas peligrosas o muy activas, nos dará una mejor posición para determinar el daño relativo que cada una de ellas puede efectuar al momento de ser contaminante residual de un producto. No obstante, la búsqueda bibliográfica de este valor para drogas de baja peligrosidad puede ser no exitosa o costosa, ya que existen sitios que ofrecen esta información, pero no suelen ser fácilmente accesibles desde el punto de vista económico para todos. Un

camino para estos casos en particular es efectuar una evaluación farmacológica de cada IFA y poner en comparación la información relativa a: Sitio de acción del Fármaco, Reacciones Adversas Medicamentosas y Contraindicaciones de éste. Si bien la recopilación de la información demanda bastante tiempo, la misma es de fácil acceso y sin valor agregado. En el próximo ejemplo se podrá ver cómo construir una tabla con esta información y los demás factores para la obtención del valor NPR (Número de prioridad de riesgo).

Cálculo del Número de Prioridad de Riesgo (NPR)

De acuerdo a toda la explicación precedente, se deben categorizar los diferentes factores de riesgo que integran el cálculo del NPR. Recordar que los procesos tienen pasos, que dichos pasos tienen parámetros con rangos variables y que las características y factores de nuestros residuos pueden provocar un "Modo de Fallo". Estas características y factores de los residuos fueron los que se identificaron como peligros y para los que se deben estimar:

- Probabilidad de Ocurrencia, que es la "probabilidad" de que el Fallo Ocurra.
- Probabilidad de Detección o "Detectabilidad" del Fallo, que pone en juego la probabilidad que existe de detectar el Fallo una vez que el mismo ocurrió previo a que llegue al paciente.
- Severidad, que guarda relación al daño real que produciría el residuo contaminante si este llegara al paciente.

De esta manera se debe construir una tabla donde queden expresados los niveles de riesgo que serán aplicados de manera sistemática a todos los IFAs que son analizados (Ver Tabla 3):

La Tabla 3 es un ejemplo de cómo los riesgos pueden ser tratados. Hay formas de estimación cualitativa y cuantitativa. No obstante, para el fin requerido, el resultado final debe ser numérico para poder listar los diferentes valores comparados. Por ejemplo, en la columna de Categorización del riesgo se muestra que existen términos descriptivos y colores para un primer acercamiento al análisis del riesgo, pero luego los mismos son vinculados a valores numéricos para un posterior cálculo del NPR. Similarmente, todos los cortes que son introducidos dentro de los valores de Solubilidad, Potencia, etc. son arbitrarios con racionales que respalden su elección. Por ejemplo, para solubilidad se utiliza un recorte parcial de la tabla de solubilidades de la USP [8], para la Severidad del Sitio de acción se utiliza la agrupación existente en el libro de Farmacología Humana de Jesús Florez [7], es decir, no existen patrones definidos de aplicación en dicha segmentación. El propósito final de un análisis de riesgos es comparar de forma sistemática todos los exponentes de la misma manera para no sesgar interpretaciones subjetivas del analista al momento de la selección del IFA peor caso. No obstante, al ser una herramienta rígida, amerita una interpretación final del resultado que puede ser objetado o cambiado bajo un racional superior al elegido para la selección de los que fueron inicialmente fijados. La tabla también exhibe las dos maneras de tratar la Severidad. El analista debe elegir cuál es la indicada para el tipo de productos que debe tratar.

Como se ve en la última columna, el producto final de Ocurrencia, Detectabilidad y Severidad da por resultado el Número de Prioridad de Riesgo, que lista desde el de mayor valor como de mayor riesgo o IFA "peor caso", al de menor valor en orden decreciente de riesgo.

Una vez que se obtiene el IFA "peor caso", se debe estipular cuál es su nivel de aceptación para establecer si la limpieza fue exitosa y concluir la valoración del riesgo.

Categori-zación		Probabilidad de ocurrencia					Probabilidad de detección	Severidad			NPR
								IFA peligroso	IFA no Peligroso		
Valor de riesgo asociado		O1 Solubilidad		O2 Potencia	O3 Frecuencia de fabricación	O4 Dificultad de limpieza	D Detectabilidad organoléptica del residuo	S1 PDE Para IFAs peligrosos o de alta actividad) µg/ persona/ día	S2 a Sitio de acción	S2 b RAM y CI	NPR = O1 x O2 x O3 x O4 x D x S
		Término descriptivo	(Extracto de tabla USP, valores en mLsv/g)	(% de IFA en fórmula)	Número de Lotes/ Número de campañas	Datos empíricos colecta-dos por consulta a colabo-radores					
Crítico	10	Práctica mente Insolu-ble	> 10000	< 1	Mayor Valor tomado desde los históricos	Mayor dificultad de limpieza	Imposible de detectar	1.5 (Umbral para sus-tancias geno-tóxicas)	SNA y perisférico-SNC-Hormonal Metabolismo y vitaminas-Crecimiento neoplásico	Compromiso de vida	Alta prioridad
Mayor	7	Muy poco Soluble	1000 a 10000	1 a 5	Valores intermedios de ponderación	Valores intermedios de ponderación	Valores intermedios de ponderación	Valores intermedios de ponderación	Enfermedades infecciosas-Medio interno	Pérdida de funciones de manera crónica	Valores intermedios de ponderación
Medio	5	Soluble	10 a 30	5 a 10					Aparatos circulatorio y respiratorio	Pérdida de funciones de manera reversible	
Menor	3	Fácilmente Soluble	1 a 10	10 a 50					Mediadores celulares de la inflamación e inmunidad	Daños menores a la salud	Baja prioridad
Nulo	1	Muy Soluble	< 1	> 50	Menor Valor tomado desde los históricos	Menor dificultad de limpieza		Mayor valor	Aparato digestivo	No provoca daños	

Tabla 3: Ejemplo de Categorización de factores de riesgo para la evaluación del IFA peor caso

Nivel de aceptación o Criterio de Aceptación

Introducción

Un nivel de aceptación debe reunir diferentes características. El mismo debe ser numérico, estar basado en racionales científicos con criterios lógicos, entendibles y bien documentados. El valor encontrado debe ser práctico en el sentido de que debe ser apropiado a la situación de limpieza real que debe ser validada. Además debe ser verificable a través de métodos analíticos validados. Lo anteriormente citado puede parecer redundante, pero ya no es aceptada una liberación de limpieza a través de la aceptación visual de los equipos, si dicho dato no encuentra valores sustentables de validación de la práctica a través de vinculación con concentraciones científicamente fundadas que aseguren no ocasionar daño al paciente. Es decir, el valor de aceptación visual, comúnmente validado entre 1 y 4 µg/ cm^2 a nivel global, debe guardar correlación al estudio de los IFAs que presentan posibilidad de ser contaminantes en dichos valores sin peligrosidad, y su validez demostrada a través de corridas de validación que manifiesten el estudio de variables como ser, diferentes personas, distancia de observación, tipo de iluminación, diferentes materiales constituyentes de equipos y su correspondencia con los puntos más difíciles de limpiar conocidos como puntos críticos de control.

Para establecer los niveles de aceptación se deben construir matrices que contengan la información de todos los productos que comparten el equipo que se desea validar. De ellos se deben listar los tamaños de lotes, superficie del tren compartido de equipos y dosis máxima diaria que puede ser administrada a un paciente. Además se debe conocer su formulación, especificaciones del producto y vía de administración, que por ejemplo cobra importancia al momento de establecer límites para el *bioburden* o establecer factores de seguridad. También, tal como se mencionó anteriormente se debe conocer en detalle el proceso de limpieza, los agentes utilizados para llevar adelante la misma, su formulación y datos de toxicidad, como así también los mecanismos de acción de ellos que permiten comprender la interacción con el residuo que se desea cuantificar. Un agente de limpieza que por ejemplo actúa por oxidación podría modificar estructuras moleculares de ingredientes activos y producir productos de degradación que presenten mayor toxicidad que el compuesto original. Esto podría recaer al momento del análisis en la obtención de un falso negativo por cuantificar valores seguros de la molécula original, cuando en realidad la misma ya no se encuentra presente luego de la limpieza. Es decir, los residuos podrían arrojar valores por debajo del límite de aceptación y dar por apto un proceso de limpieza cuando en realidad lo que sucedió fue que por desconocimiento de su reacción con el agente de limpieza el mismo se transformó en un compuesto más tóxico que nuestra técnica analítica no permite reconocer. Para sumar complejidad a los hechos, los residuos químicos de ingredientes activos que se desean mantener bajo control habitualmente se encuentran muy cerca de límites de detección y cuantificación de las técnicas analíticas. Esto hace que buscar productos de degradación de los mismos esté condicionado por la sensibilidad de los instrumentos que habitualmente se utilizan para ello, como ser cuantificación por cromatografía líquida de alta performance con detectores convencionales de luz ultravioleta o en el mejor de los casos, arreglo de diodos. Siendo una de las premisas mencionada anteriormente aquella que dice que el límite de aceptación debe ser verificable por técnicas analíticas validadas, ante esta situación se debe evaluar el costo-beneficio de adquirir equipos con diferente fundamento o detectores asociados de mayor sensibilidad, conllevando a técnicas analíticas habitualmente poco prácticas para liberar o validar limpiezas. Cuando la sensibilidad analítica afecta la correcta cuantificación del residuo determinado como "peor caso", suele ser una opción el uso de equipos productivos para dichos procesos de elaboración de manera exclusiva, lo que suele llamarse como "Equipos dedicados", como es requerido en productos de alta potencia o peligrosidad, hormonas, citostáticos, antibióticos penicilínicos, etc.

Obtención del nivel de aceptación

El cálculo se puede dividir en dos partes, el valor permitido en el producto siguiente y el valor total permitido por arrastre o comúnmente llamado "*Carryover*".

- Valor permitido en el producto siguiente

  Para iniciar los cálculos, primero se debe distinguir el tipo de residuo que se desea mantener bajo control. Esto permite identificar el tipo de tratamiento que se puede admitir al momento de establecer el racional que va a respaldar el control sobre dicho residuo identificado. Para residuos químicos los cálculos están basados en el peor caso identificado en el análisis de riesgos presentado con anterioridad, y sus límites se pueden obtener a través de la dosis de droga activa o por la toxicidad relativa a su peligrosidad. Para agentes de limpieza o productos de síntesis intermedios, el enfoque utiliza datos extrapolados de la toxicidad de los mismos.

  Utilizar las siguientes formas de cálculo:

  1) *La dosis de droga activa:* Este enfoque se usa para IFAs que no presentan alta actividad ni peligrosidad. Como se vio antes en este capítulo, ofrece una alternativa viable al uso de *PDE* para elaboraciones que utilizan equipos no dedicados. Comúnmente el valor refiere a un factor de seguridad de 1 en 1000 para fabricaciones "*per oral*" que afecta a la mínima dosis terapéutica del activo residual del producto "contaminante", en la máxima dosis diaria del producto "contaminado" o subsiguiente en la fabricación. Para este último suele utilizarse el criterio de "peor caso" para el cual se selecciona el valor de MCTD mayor de todos los posibles candidatos de cruce durante una fabricación de rutina cuyo valor ha sido establecido durante la construcción de las matrices mencionadas con anterioridad. Se calcula el Límite de Aceptación del Residuo en el producto siguiente según:

$$LAR = \frac{mdda \times FS}{MCTD}$$

Donde:

LAR: Límite de aceptación del residuo. Este valor se expresa comúnmente en ppm (partes por millón). Para ello esto las unidades pueden adoptar microgramos para mdda y gramos o mililitros para MCTD.

mdda: Mínima dosis terapéutica activa del producto "contaminante"

FS: Factor de seguridad (Uso globalmente aceptado: 1/1000 para "per oral", 1/10 para tópicos y 1/10000 para inyectables)

MCTD: Máxima cantidad de tomas diarias del producto "contaminado"

Nota: Esta ecuación pueden diferir para casos en los que un racional científico establezca un criterio que respalde la decisión del cambio basado en un análisis de riesgos. Por ejemplo, la mdda en productos cuya administración es semanal podría tomar dicho valor asumiendo la toma del medicamento como aquella en la que el producto terapéuticamente es utilizado o asignar un criterio "peor caso", siempre pensando en IFAs como residuos, y utilizar el valor mdda / 7 o el valor MCTD x 7 para encontrar un LAR más exigente. De esta manera, podemos garantizar que los efectos residuales de dichos IFAs como contaminantes que deseamos mantener bajo control, poseen una menor probabilidad de ocurrencia respecto al riesgo que puede producir dicha contaminación.

2) *La toxicidad del residuo:* Como se menciona antes en este capítulo, existen dos enfoques posibles para la utilización de criterios de toxicidad. Uno de ellos es el PDE [3, 4] que aplica a IFAs, productos intermedios de síntesis y productos de degradación. Este enfoque por lo general es requerido para IFAs de alta peligrosidad o actividad en el tratamiento de residuos de equipos no dedicados. Un segundo enfoque es el que utiliza la LD_{50} que aplica a residuos de agentes de limpieza que no poseen una dosis terapéutica.

   a) Cálculo de ADE (Valor de exposición diaria aceptable) basado en enfoque de ISPE para Risk-MaPP [3]:
   Nota: El término PDE es introducido por la agencia europea de medicamentos (EMA) [2] como extensión de los criterios de ICHQ3C (R6) [5] utilizados para solventes residuales. Tanto EMA como ISPE, aceptan que ADE y PDE son esencialmente sinónimos. Abajo se presentan ambas fórmulas de cálculo para conocimiento del lector (Ecuaciones 2 y 3). Considerar que estos cálculos son desarrollados por profesionales toxicólogos que establecen los límites basados en la salud a través de datos toxicológicos y farmacológicos obtenidos de estudios preclínicos, ensayos clínicos y otra información complementaria para el desarrollo de factores de seguridad.

   Según se menciona más arriba en este capítulo, este enfoque establece la seguridad de una persona que se encuentra en exposición diaria y durante toda la vida al residuo que se encuentra en evaluación. Para ello primero busca identificar el NOAEL (en animales o a través de datos relevantes en humanos) del residuo. Luego el ADE es estimado por calificación toxicológica basada en el peso corporal y una serie de factores de ajustes.

$$ADE = \frac{NOAEL \times PC}{UFc \times FT \times FF}$$

Donde:

ADE: *Acceptable Daily Exposure* (Valor diario de exposición aceptable)

NOAEL: *No Observable Adverse Effect Level* (Nivel donde no se observan efectos adversos)

PC: Peso corporal (El valor que refiere la EMA para un adulto sano es de 50 kg y FDA acepta 60 kg. No obstante deben considerarse posibilidades de cruces entre productos pediátricos en los cuales otros valores deberán ser utilizados)

UFc: Factor de incerteza que incluye factores de variabilidad interespecies, diferencia intraespecie, extrapolación subcrónica a crónica, extrapolación LOAEL (Mínimo nivel de efectos adversos) a NOAEL (Nivel donde no se observan efectos adversos y posibilidad de contar con estudios toxicológicos incompletos.

FT: Factor basado en el juicio de un toxicólogo

FF: Factor farmacocinético que permite contemplar las diferentes vías de exposición.

$$PDE = \frac{NOAEL \times PC}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

Donde:
PDE: *Permitted daily exposure (Valor diario de exposición permitido)*

NOAEL: No Observable Adverse Effect Level (Nivel donde no se observan efectos adversos)

PC: Peso corporal (El valor que refiere la EMA para un adulto sano es de 50 kg y FDA acepta 60kg. No obstante deben considerarse posibilidades de cruces entre productos pediátricos en los cuales otros valores deberán ser utilizados)

F1: Factor de ajuste interespecies

F2: Factor de ajuste intraespecie

F3: Factor de ajuste que contempla la duración del estudio

F4: Factor de ajuste para la severidad del efecto o la caída de la curva de dosis-respuesta

F5: Factor que contempla el uso de LOAEL (Nivel más bajo de dosis que provoca efectos adversos) por no contar con el valor de NOAEL.

b) *Cálculo basado en LD_{50} (Dosis Letal 50):* En este caso, el valor de toxicidad es obtenido de estudios de toxicidad aguda, también denominados de corto plazo. Como se menciona anteriormente, los residuos que utilizan esta modalidad de cálculo son aquellos que no presentan dosis terapéutica y refieren habitualmente a productos intermediarios de síntesis o agentes de limpieza. Para ellos, el NOEL es estimado a través de la LD_{50} según la siguiente ecuación:

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times PC}{F1}$$

Donde:

NOEL: *No Observable Effect Level* (Nivel donde no se observan efectos)

LD_{50}: Dosis Letal 50% en mg/kg de peso corporal (Utilizar apropiada vía de administración)

PC: Peso corporal (El valor que refiere la EMA para un adulto sano es de 50 kg y FDA acepta 60kg. No obstante, deben considerarse posibilidades de cruces entre productos pediátricos en los cuales otros valores deberán ser utilizados)

F1: Factor de incerteza seleccionado por toxicólogos. El valor acumulativo comúnmente utilizado no es mayor que 1000.

Una vez que el valor NOEL es estimado, se procede a calcular el valor seguro que puede ser ingerido del residuo en estudio de acuerdo a:

$$VSR = \frac{NOEL}{F2}$$

Donde:

VSR: Valor seguro de residuo que puede ser ingerido.

NOEL: *No Observable Effect Level* (Nivel donde no se observan efectos)

F2: Factor de incerteza seleccionado por toxicólogos. El valor acumulativo comúnmente utilizado no es mayor que 1000.

Una vez que el valor seguro de residuo es calculado, se procede a calcular el límite de aceptación del residuo en estudio de acuerdo a:

$$LAR = \frac{VSR}{MCTD}$$

Donde:

LAR: Límite de aceptación del residuo en el producto siguiente. Este valor se expresa comúnmente en ppm (partes por millón).

VSR: Valor seguro de residuo que puede ser ingerido.

MCTD: Máxima cantidad de tomas diarias del producto "contaminado".

- Valor total permitido por arrastre o comúnmente llamado "*Carryover*"

Una vez que el límite de aceptación del residuo permitido en el producto siguiente ha sido determinado, el valor total máximo permitido por arrastre para la fabricación en el producto siguiente, puede ser calculado. El propósito de este cálculo es escalar el dato obtenido por el uso de un medicamento contaminado, al tamaño total de un lote comercial como se puede ver en la siguiente ecuación:

$$MAC = LAR \times TL$$

Donde:

MAC: *Maximun Allowable Carryover*- Valor máximo permitido por arrastre del residuo en la fabricación siguiente. (En este caso se prefiere utilizar las siglas en inglés por ser las comúnmente reconocidas en la Industria. También se puede encontrar como MACO).

TL: Tamaño de Lote del producto "contaminado" o subsiguientemente fabricado. Para la construcción de un criterio general, y del mismo modo que para las MCTD, se suele utilizar el criterio de "peor caso", que para el tamaño de lote, es el mínimo de todos los posibles candidatos de cruce obtenidos de las matrices construidas con anterioridad.

Nota: Tener cuidado con las unidades de las variables al extrapolar el LAR al tamaño comercial del lote subsiguientemente fabricado. Siendo que el LAR es expresado en ppm y el tamaño de lote en Kg o L, suele utilizarse un factor de 1000 multiplicando para corregir según se indica en la Tabla 4:

Tabla 4

LAR en ppm	Multiplicar por:	Resultado final expresado en;
µg de residuo "contaminante" /g de producto "contaminado"	1000 g de producto "contaminado"/ Kg de producto "contaminado"	µg de residuo por Lote de producto "contaminado"
µg de residuo "contaminante"/ mL de producto "contaminado"	1000 mL de producto "contaminado" / L de producto "contaminado"	

Una vez que se obtiene el MAC, se debe vincular el límite a la superficie de los equipos que comparten los productos en las diferentes elaboraciones. A través de la misma es que puede vincularse de manera directa la contaminación cruzada entre productos. Para ello, se puede utilizar también el criterio de "peor caso" obtenido de la máxima superficie encontrada en la matriz construida con anterioridad que lista los diferentes productos. Calcular de acuerdo a:

$$LRS = \frac{MAC}{STC}$$

Donde:

LRS: Valor máximo permitido por unidad de superficie compartida entre fabricaciones y que se encuentra en contacto con producto.

MAC: *Maximun Allowable Carryover* - Valor máximo permitido por arrastre del residuo en la fabricación siguiente. (En este caso se prefiere utilizar las siglas en inglés por ser las comúnmente reconocidas en la Industria).

STC: Superficie compartida entre equipos pertenecientes a los trenes de fabricación del producto "contaminado" y el subsiguientemente elaborado que denominamos "contaminado". (Recordar que puede utilizarse el criterio "peor caso" mencionado con anterioridad)

El LRS obtenido asume el criterio "peor caso" al considerar la homogeneidad en la distribución de los residuos. Es decir, una limpieza se puede considerar exitosa si los valores obtenidos por muestreo a través de técnicas de hisopado o enjuague en aquellos puntos considerados como críticos de control, cumplen con el criterio establecido por el LRS ya que dicho resultado garantiza que el resto de la superficie del equipo encuentra valores por debajo del que fue obtenido.

La vinculación del LRS al valor por hisopo o volumen de enjuague se efectúa a través de la siguiente ecuación:

$$LMA = \frac{LRS \times SM}{VM}$$

Donde

LMA: Límite de residuo en muestra de análisis en µg de residuo/ mL.

SM: Superficie de muestreo. El muestreo puede ser a través de hisopado o por método de enjuague.

VM: Volumen final de muestra. (Para hisopado considerar el volumen final en el cual se extrae el residuo y para método por enjuague el total utilizado para barrer el área designada para el muestreo)

Como se menciona antes en este capítulo, las metodologías analíticas utilizadas para la correcta cuantificación de los residuos deben estar validadas. Las mismas deben contemplar la validación de las técnicas de hisopado o enjuague con sus correspondientes factores de recuperación. También se menciona que se debe vincular el muestreo a aquellos puntos considerados como críticos de control determinados a través del uso del análisis de riesgos.

A continuación, se explica una forma posible para establecer criterios para la selección de los mismos.

Selección de puntos críticos de muestreo en equipos a través del análisis de riesgos:

Del mismo modo que fue presentado para la elección del IFA "peor caso", el análisis de riesgos nos permite ordenar criterios de selección al momento de seleccionar puntos críticos de muestreo en los equipos. Los modos de fallo atribuidos a los procesos de limpieza se esquematizan en la Tabla 5 en la columna 1. La probabilidad de detectar la falla a tiempo (D) y la severidad (S) se introducen como filas a continuación de los Modo de Fallo.

Los factores presentados a continuación son algunos de los ejemplos que comúnmente son utilizados para este ejercicio. No obstante, la experiencia de cada grupo de trabajo vinculado al estudio de los equipos que son sometidos a limpieza puede otorgar otros factores que no se encuentran enumerados en esta muestra.

1) Qué podría causar que el proceso de limpieza falle?	**2) Cuál es la probabilidad de que salga mal? (O)**			
	Nula 1	Baja 3	Media 5	Alta 7
***Dificultad de limpieza* (O1):** Factor relacionado a la geometría y/o acceso que permite la zona elegida para ser limpiada.	La zona es lisa y de fácil acceso. Puede ser limpiada de manera correcta	La zona no es lisa, pero es de fácil acceso o puede desensamblarse para limpieza	La zona no es lisa, o presenta dificultad de acceso o no puede ser desensamblada para limpieza	La zona no es lisa, presenta dificultad de acceso y no se puede desensamblar para limpieza
***Dificultad de secado* (O2):** Factor relacionado a la geometría y/o acceso que permite la zona para ser secada totalmente.	La zona es lisa y de fácil acceso. Puede ser secada de manera correcta	La zona no es lisa, pero es de fácil acceso o puede desensamblarse para el secado	La zona no es lisa, o presenta dificultad de acceso o no puede ser desensamblada para el secado	La zona no es lisa, presenta dificultad de acceso y no se puede desensamblar para el secado
***Posibilidad de retención de producto* (O3):** Factor relacionado a la geometría de la zona elegida que a pesar de poder ser limpiada presenta características que podrían ocluir la salida de contaminantes. (Ej.: juntas, burletes, etc.)	La zona es lisa sin posibilidad de retención de residuos	La zona no es lisa pero no presenta posibilidad de retención de residuos	La zona puede retener contaminantes pero puede ser desensamblada para una correcta limpieza	La zona puede retener contaminantes y no puede ser desensamblada para una correcta limpieza
***Posibilidad de re-contaminación* (O4):** Factor relacionado al equipo o parte del mismo que necesite una operatoria manual para su ensamblaje posterior a la limpieza	La zona no debe ser desensamblada	La zona es desensamblada pero la manipulación es sobre partes que no tienen contacto con producto	La zona requiere de ensamble posterior a la limpieza con manipulación sobre partes que presentan contacto con producto	La zona requiere ensamble con personal que ingresa al equipo para llevar a cabo la tarea
***Probabilidad de Detección de falla a tiempo* (D):** Factor relacionado a la posibilidad de visualización de la falla al momento de su ocurrencia. El riesgo de este factor puede ser disminuido si existen instancias posteriores de control.	La zona es de fácil acceso para la inspección instrumental o mecánica a través de método visual/físico/químico	La zona no es de fácil acceso para la inspección visual pero si instrumental o mecánico a través de método físico/químico	La zona no es de fácil acceso para la inspección visual pero si instrumental o mecánico a través de método químico	La zona no puede ser inspeccionada posterior a la limpieza
3) Cuáles son las consecuencias de que salga mal? ***Severidad* (S):** Guarda relación con el daño que produciría el peligro una vez que ocurre y no puede ser detectado a tiempo.	La falla no afecta la calidad del producto de manera significativa	La falla afecta características estéticas menores del producto	La falla puede ocasionar problemas de calidad en el producto, afectar la salud del paciente y/o tener consecuencias legales	La falla ocasiona problemas de calidad en el producto, afecta la salud del paciente y/o tiene consecuencias legales

Tabla 5: Ejemplo de Categorización de factores de riesgo para la evaluación puntos críticos de muestreo

Cálculo del Número de prioridad de riesgos:

Se construye una matriz por multiplicación de todos los factores involucrados en el análisis de riesgos a través de la siguiente ecuación:

$$NPR = O1 \times O2 \times O3 \times O4 \times D \times S$$

Criterios aplicados para interpretar la siguiente tabla de NPR:

Todo valor en la Tabla 6 de números de prioridad de riesgos relacionado a la severidad dentro de la zona roja es considerado crítico y debe ser muestreado durante los ejercicios de validación de limpieza y durante la verificación continua de los procesos. Implícitamente esto considera que un factor de severidad 7 es crítico por definición y debe ser controlado. Los puntos cuya celda es verde pueden ser muestreados con fines representativos de partes del equipo, aunque los mismos no sean considerados críticos por esta evaluación. Los valores intermedios entre verde y rojo, representados por la línea de separación amarilla, son puntos de criticidad media y deberían ser monitoreados solo en los ejercicios de calificación del proceso de limpieza.

Matriz de criticidad en la elección del punto de muestreo								
Probabilidad de Riesgo					**Factor de severidad (S)**			
O1	O2	O3	O4	D	1	3	5	7
					Nula	Baja	Media	Alta
1	1	1	1	0,25	0,25	0,75	1,25	1,75
3	3	3	3	0,5	41	122	203	284
5	5	5	5	0,75	469	1407	2345	3283
7	7	7	7	1	2401	7203	12005	16807

Tabla 6: Matriz de criticidad por cálculo de número de prioridad de riesgos

Evaluación del riesgo para la selección de un punto crítico de muestreo:

Esta información debe ser introducida en el protocolo de validación. El formato de la Tabla 7 de evaluación solo es un ejemplo de aplicación del análisis de riesgos para la selección de un punto de muestreo.

Tabla de evaluación	
Punto de muestreo	
	Breve descripción del punto: Acometida para ingreso de solución aglutinante.
	Superficie de muestreo: 100 cm^2

Abreviatura	Descripción de falla	Probabilidad de falla				Valor seleccionado	NPR
		Nula	Baja	Media	Alta		
O1	Es una zona de difícil limpieza	1	3	5	7	5	**938**
O2	Es una zona de difícil secado	1	3	5	7	5	
O3	Es una zona que puede retener contaminante	1	3	5	7	5	
O4	Es una zona que puede ser re-contaminada	1	3	5	7	3	
D	Es posible de detectar la falla a tiempo	1	0,75	0,5	0,25	0.5	
S	Factor de severidad	1	3	5	7	**5**	

Tabla 7: Ejemplo de aplicación de herramienta de análisis de riesgos para la evaluación del punto de muestreo

Interpretación: Siendo que el valor de Severidad es 5, el valor obtenido por encima de 203 es considerado punto crítico de muestreo. Un valor menor a 1,25 hubiera significado que el punto no es crítico y entre 1,25 y 203 su criticidad sería media.

Bibliografía:

1: PDA Technical Report No.29 (Revised 2012): Points to Consider for Cleaning Validation

2: 20 November 2014 EMA/CHMP/ CVMP/ SWP/169430/2012 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities

3: Baseline Guide Risk Manufacture of Pharmaceutical Products (Risk-MaPP), First Edition; ISPE 2010

4: Baseline Guide Volume 7: Risk-Based Manufacture of Pharma Products, Second Edition; ISPE 2017; A Guide to Managing Risk Associated with Cross-Contamination

5: ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE-IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS-Q3C(R6)-Current Step 4 version dated October 20, 2016

6: ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE-QUALITY RISK MANAGEMENTQ9-Current Step 4 version dated 9 November 2005

7: Farmacología Humana. Jesús Florez 6° Edición

8: USP 40 (United States Pharmacopeial)